



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Odontología

Escuela Académico Profesional de Odontología

**Actividad antifúngica del *Citrus paradisi* “toronja”
sobre cepas de *Candida albicans* aisladas de pacientes
con estomatitis subprotésica**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Cirujano Dentista

AUTOR

Diana Eugenia CHURATA OROYA

ASESOR

Donald RAMOS PERFECTO

Lima, Perú

2016



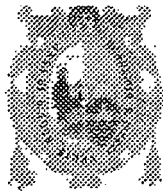
Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Churata D. Actividad antifúngica del *Citrus paradisi* “toronja” sobre cepas de *Candida albicans* aisladas de pacientes con estomatitis subprotésica [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Odontología, Escuela Académico Profesional de Odontología; 2016.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

UNIDAD DE ASESORÍA Y ORIENTACIÓN DEL ESTUDIANTE



ACTA

Los Docentes que suscriben, reunidos el diez de junio del 2016, por encargo de la Sra. Decana de la Facultad, con el objeto de constituir el Jurado de Sustentación para optar el Título Profesional de Cirujano Dentista de la Bachiller:

CHURATA OROYA, Diana Eugenia

CERTIFICAN :

Que, luego de la Sustentación de la Tesis « **ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL CITRUS PARADISI "TORONJA" SOBRE CEPAS DE CANDIDA ALBICANS AISLADAS DE PACIENTES CON ESTOMATITIS SUBPROTÉSICA** » y habiendo absuelto las preguntas formuladas, demuestra un grado de aprovechamiento SOBRESALIENTE, siendo calificada con un promedio de: Dieciocho

(en letras)

18
(en números)

En tal virtud, firmamos en la Ciudad Universitaria, a los diez días del mes de junio del dos mil dieciséis.

PRESIDENTE DEL JURADO

Mg. Blg°. Hilda Moromi Nakata

MIEMBRO

C.D. Jorge Eleodoro Villavicencio Gastelú

MIEMBRO (ASESOR)

Mg. C.D. Donald Ramos Perfecto

Escala de calificación: Grado de Aprovechamiento:
Sobresaliente (18-20), Bueno (15-17), Regular (12-14), Desaprobado (11 ó menos)
Criterios : Originalidad, Exposición, Dominio del Tema, Respuestas.

JURADO DE SUSTENTACIÓN

- **PRESIDENTE:** Mg. Blg^º. Hilda Moromi Nakata
- **MIEMBRO:** C.D. Jorge Eleodoro Villavicencio Gastelú
- **MIEMBRO ASESOR:** Mg. C.D. Donald Ramos Perfecto

DEDICATORIA

A Dios por ser la luz que guía mi camino y por colocar a las personas indicadas en mi vida.

A mis padres Oscar y Norma por darme la vida, por brindarme su amor día a día, por su confianza, por ser ejemplo de perseverancia y ser mi apoyo constante en todas las metas que me propongo.

A mi hermana Maite por sus palabras de aliento y siempre brindarme su ayuda cuando la necesitaba.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor Mg. C.D. Donald Ramos Perfecto, profesor de Microbiología de la Facultad de Odontología de la UNMSM, por su apoyo continuo y el tiempo dedicado a la realización de la tesis.

Al Dr. QF. Américo Castro Luna, docente de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, quien ha demostrado ser maestro por su desinteresado apoyo constante y colaboración en la obtención del aceite esencial de toronja.

A la Mg. Blga Hilda Moromi Nakata, presidenta de jurado por sus aportes y ayuda brindada en la realización de la investigación.

Al C.D. Jorge Eleodoro Villavicencio Gastelú por sus aportes como miembro de jurado en la presente investigación.

A la Mg. C.D. Teresa Evaristo, docente del Dpto. de Odontología Biosocial de la Facultad de Odontología de la UNMSM por su colaboración en la elaboración de la parte metodológica y estadística del presente trabajo.

Al personal del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la UNMSM, por su disposición y paciencia durante la ejecución del proyecto.

A mi alma mater “Universidad Nacional Mayor de San Marcos” y a la Facultad de Odontología por la educación impartida, los llevaré en mi corazón en todo momento y lugar.

RESUMEN

En el presente trabajo se investigó la actividad antifúngica *in vitro* del aceite esencial de *Citrus paradisi* “toronja” sobre cepas de *Candida albicans* aisladas de pacientes con diagnóstico de estomatitis subprotésica, se empleó el método de difusión en agar con pozos. La cepa de *Candida albicans* se obtuvo de muestras de hisopado de mucosa de pacientes con estomatitis subprotésica y se identificó por medio de las características morfológicas de sus colonias y la prueba de Tubo germinativo. El inóculo fue estandarizado al 0,5 de la escala de Mc Farland y sembrado en 12 placas con agar dextrosa sabouraud. Se hicieron pozos con un sacabocado de 6 mm de diámetro, se depositaron 50 µL de las diferentes concentraciones del aceite esencial y se procedió a la incubación en aerobiosis a 37°C por 48 horas. El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS Versión 23. Las concentraciones al 25; 12,5; 6,25; 3,13 y 1,56 % presentaron un halo de inhibición promedio de 12,6; 10,3; 7,8; 6,8 y 6,3 mm respectivamente, mientras que al 0,78 y 0,39 % no presentaron actividad antifúngica. La CMI promedio para *Candida albicans* fue de 6,25 %. Se realizó la prueba de Kruskal Wallis y se determinó que existe diferencia estadísticamente significativa $p(0,00) < 0,05$ de promedios entre las concentraciones. Se concluye que el aceite esencial de *Citrus paradisi* “toronja”, presenta actividad antifúngica sobre cepas de *Candida albicans*.

Palabras clave: Actividad antifúngica, *Citrus paradisi*, *Candida albicans*, Estomatitis subprotésica

ABSTRACT

In this present study investigated the *in vitro* antifungal activity of the essential oil of *Citrus paradisi* "grapefruit" on strains of *Candida albicans* isolated from patients diagnosed with denture stomatitis, the agar well diffusion method was used. The strains of *Candida albicans* was obtained from swab samples of mucosa of patients with denture stomatitis and it was identified by morphological characteristics of colonies and germ tube test. The bacterial colony was adjusted to 0,5 Mcfarland standard and these was cultivated on 12 Sabouraud dextrose agar plates. Wells were made with cork borer of 6 mm diameter, 50 µL dilute essential oils of the different concentrations were dispensed into each well and the plates were incubated aerobically at 37° C for 48 hours. Statistical analysis was performed using SPSS version 23. Concentrations 25; 12,5; 6,25; 3,13 and 1,56 % had a halo of inhibition average of 12,6; 10,3; 7,8; 6,8 and 6,3 mm respectively, while 0,78 and 0,39 % didn't show antifungal activity. The minimal inhibitory concentration (MIC) average for *Candida albicans* was of 6,25 %. Kruskal Wallis test was performed and it was determined that there is statistically significant difference $p(0,00) < 0,05$ averages between concentrations. It is concluded that the essential oil of *Citrus paradisi* "grapefruit" exhibit antifungal activity on strains of *Candida albicans*.

Keywords: Antifungal activity, *Citrus paradisi*, *Candida albicans*, Denture stomatitis

CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN	1
II. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	2
2.1 Área problema	2
2.2 Delimitación	3
2.3 Formulación	3
2.4 Objetivos	4
2.5 Justificación	5
2.6 Limitaciones	6
III. MARCO TEÓRICO	7
3.1 Antecedentes	7
3.2 Bases teóricas	13
3.3 Definición de términos	27
3.4 Hipótesis	28
3.5 Operacionalización de variables	29
IV. METODOLOGÍA	30
4.1 Tipo de investigación	30
4.2 Población y muestra	30
4.3 Procedimientos y técnicas	30
4.4 Procesamiento de datos	36
4.5 Análisis de resultados	36
V. RESULTADOS	37
VI. DISCUSIÓN	49
VII. CONCLUSIONES	53
VIII. RECOMENDACIONES	54
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	55
X. ANEXOS	63

I. INTRODUCCIÓN

La cavidad oral constituye la mayor parte del aparato estomatognático y se encuentra sujeta a infecciones micóticas, principalmente producidas por *Candida*. Las especies de *Candida*, en especial *Candida albicans*, son los principales patógenos para el desarrollo de la estomatitis subprotésica, la cual es la infección más común en los pacientes portadores de prótesis removibles.

El aumento en la prevalencia de las micosis, la aparición de cepas fúngicas resistentes a los agentes antimicóticos empleados en la actualidad y los efectos secundarios que estos provocan en los pacientes son, sin duda, algunos indicadores de la necesidad de encontrar o desarrollar nuevos productos naturales que produzcan menor toxicidad, resistencia y reacciones adversas que los fármacos tradicionales, además de estar al alcance de las clases más populares.

En los últimos años el uso de alternativas naturales a través de plantas con propiedades medicinales está siendo estudiado científicamente, con el fin de utilizarlas en el tratamiento de afecciones bucales más prevalentes en la población; la flora peruana es muy rica en especies a las que la medicina tradicional atribuye propiedades terapéuticas muchas no investigadas, como es el caso del *Citrus paradisi* que posee un inmenso potencial medicinal. Con todo lo expuesto, la presente investigación determinó la actividad antifúngica del aceite esencial de *Citrus paradisi* “toronja” sobre cepas de *Candida albicans*.

II. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

2.1 ÁREA PROBLEMA

Aproximadamente, el 60 % de la población mundial utiliza plantas y productos derivados de ellas en su tratamiento, los cuales son considerados como una de las “medicinas” de gran importancia por su efectividad terapéutica. La farmacopea peruana tiene muchas plantas con aplicaciones curativas, investigaciones señalan que existen más de 3,000 especies. El empleo de plantas medicinales y productos derivados de las mismas están aumentando de manera importante, ¹ tal como la toronja (*Citrus paradisi*) que pertenece al género *Citrus*, familia Rutaceae. La toronja se ha utilizado en muchos países como: antimicrobiano, antifúngico, antiviral, antiinflamatorio, antioxidante, astringente, también prevención del cáncer, regeneración celular, reducción del colesterol, mantenimiento de la salud del corazón, lupus, nefritis, artritis reumatoide, pérdida de peso, desintoxicación, conservante y limpieza.²

Por ello, el propósito de esta investigación es demostrar la actividad antifúngica del aceite esencial del *Citrus paradisi* “toronja” sobre *Candida albicans*, principal agente etiológico de la estomatitis subprotésica.

2.2 DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA

La medicina tradicional, en los últimos años ha cobrado importancia como terapia alternativa al uso de medicamentos sintéticos producidos en la industria farmacéutica, los cuales producirían toxicidad y resistencia, razón por la cual se está procurando investigar nuevos agentes antifúngicos más potentes y sobre todo seguros, como es el caso del *Citrus paradisi* que se encuentra en esta investigación como fuente material para ser estudiado como antifúngico.^{3, 4}

En relación a las enfermedades fúngicas en seres humanos, se ha presentado un incremento en su incidencia. Se considera que cuatro de cada mil pacientes que acuden a consulta dental presentan síntomas de infección candidiásica.⁵

En la cavidad oral las infecciones por *Candida albicans* adoptan varias formas clínicas, como la estomatitis subprotésica que es un proceso inflamatorio de la mucosa bucal y puede llegar a afectar a más del 70 % de los portadores de prótesis removible.^{6, 7}

2.3 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿El aceite esencial de *Citrus paradisi* “toronja”, en distintas concentraciones presenta actividad antifúngica *in vitro* sobre cepas de *Candida albicans* procedente de muestras de pacientes con estomatitis subprotésica?

2.4 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

2.4.1 OBJETIVO GENERAL

- Determinar la actividad antifúngica *in vitro* del aceite esencial de *Citrus paradisi* “toronja” sobre cepas de *Candida albicans*.

2.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la actividad antifúngica del aceite esencial de *Citrus paradisi* sobre cepas de *Candida albicans* procedente de muestras de pacientes con estomatitis subprotésica.
- Determinar la actividad antifúngica del aceite esencial de *Citrus paradisi* a concentraciones de 25; 12,5; 6,25; 3,13; 1,56; 0,78 y 0,39 % sobre cepas de *Candida albicans*.
- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial de *Citrus paradisi* “toronja” sobre cepas de *Candida albicans*.
- Comparar la actividad antifúngica del aceite esencial de *Citrus paradisi* “toronja” a diferentes concentraciones sobre el crecimiento de *Candida albicans*.

2.5 JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

La flora peruana es muy rica en especies a las que la medicina tradicional atribuye propiedades terapéuticas muchas no investigadas, ⁸ como es el caso del *Citrus paradisi* que requiere estudios científicos que evidencien sus propiedades.

Se ha demostrado el poder antimicrobiano de aceites esenciales, especialmente extraídos de frutas cítricas, por lo que constituyen alternativas terapéuticas efectivas contra infecciones producidas por microorganismos patógenos causantes de enfermedades y resistentes a los antimicóticos.⁹

En este contexto, los compuestos derivados de plantas son de interés porque ellos sirven como base para el desarrollo de nuevos agentes antifúngicos. Estos compuestos naturales representarían alternativas seguras y eficaces que los agentes antifúngicos sintéticos, además de proporcionar una alternativa de tratamiento más económica y natural al alcance de la población más necesitada.

La presente investigación determinó la actividad antifúngica del aceite esencial de *Citrus paradisi* “toronja” sobre cepas de *Candida albicans*, principal agente etiológico de la estomatitis subprotésica.

2.6 LIMITACIONES DE LA INVESTIGACIÓN

- Escasas investigaciones científicas en Perú, referentes al beneficio de las propiedades del aceite esencial de *Citrus paradisi* en el campo odontológico.
- Factor limitante de tipo económico para el análisis cuantitativo de Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas que permite elucidar los componentes bioactivos del aceite esencial de *Citrus paradisi*.

III. MARCO TEÓRICO

3.1 ANTECEDENTES

Flores (1999) evaluó el perfil biológico antimicrobiano *in vitro* de aceites esenciales de especies vegetales aromáticas. El aceite esencial de *Citrus paradisi* “toronja” fue obtenido mediante destilación por arrastre de vapor de agua, para ello utilizó 1 kg del material vegetal y se obtuvo un rendimiento del 0,20 %. Evaluó la actividad bactericida y antifúngica del aceite esencial de toronja mediante la técnica de difusión en agar, encontrando inhibición del crecimiento del hongo saprófito *Neurospora crassa* y de *Staphylococcus aureus* a concentraciones de 1mg/mL. El aceite esencial de *C. paradisi* al 1,0 mg/mL no demostró actividad antifúngica contra *Candida albicans*.¹⁰

Krajewska (2001) evaluó la actividad antifúngica del extracto de toronja sobre el crecimiento de *Candida albicans*. El material utilizado en esta investigación fue la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231, 200 cepas de *Candida albicans*, 5 cepas de *Candida sp.* aisladas de pacientes con síntomas de candidiasis y 12 de dermatofitos y mohos aislados de pacientes. La susceptibilidad de la *Candida* fue determinada por el método de dilución en serie. Concluyó que el extracto de toronja al 33 % ejerce una potente actividad antifúngica sobre cepas de hongos levaduriformes y tiene una baja actividad sobre dermatofitos y mohos.¹¹

García (2003) evaluó la actividad antiinflamatoria del *Plantago major* L “llantén” y *Citrus paradisi* “toronja” en gingivitis inducida en 32 conejos a nivel del margen gingival superior e inferior de incisivos centrales. Los extractos secos (5 g de llantén y 10 g de toronja) fueron utilizados para preparar 100 g de pasta tópica. Después de 15 días de producida la

gingivitis, procedió a la aplicación de la pasta mediante un hisopado por un período de 2 minutos sobre las 32 superficies. Luego de 1 día de tratamiento observó respuesta celular severa y no se evidenció el efecto antiinflamatorio; al cabo de 3 días detectó un alto porcentaje de casos con respuesta celular moderada, continuó la vasodilatación y hubo pérdida de fibras de colágeno; a los 5 días, continuó la resolución de la inflamación con un alto porcentaje de respuesta celular leve, reparación de fibras de colágeno y disminución de la vasodilatación y la respuesta vascular. A los 7 días, se redujo el infiltrado inflamatorio celular, no presentó respuesta vascular y las fibras de colágeno se encontraron conservadas. Concluyó una buena aceptación de la pasta a los tejidos mucogingivales.¹²

Cvetnic (2004) evaluó la actividad antibacteriana y antifúngica del extracto etanólico de semillas y pulpa de *Citrus paradisi* toronja sobre 20 bacterias y 10 cepas de levaduras mediante los métodos de difusión en agar con pozos y diluciones seriadas en caldo. En agar dextrosa sabouraud, realizó pozos de 6, 8 y 10 mm de diámetro a los cuales aplicó 25 y 50 µl de solución; etanol al 70 % fue el control negativo e incubó a 25 ° C por 18 horas. El extracto demostró actividad antifúngica contra todas las levaduras en las concentraciones desde 8,25 % a 16,50 % (m / V). *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida krusei* y dos cepas de *C. albicans* mostraron mayor sensibilidad que las otras levaduras ensayadas. La cepa de *Candida albicans* presentó halos de inhibición de 9 – 11 mm. La Concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico sobre cepas de *Candida albicans* fue de 8,25 % m/v. El extracto demostró tener actividad contra todas las bacterias Gram positivas, pero no contra las bacterias Gram negativas ensayadas. La determinación de espectrometría mostró que el

extracto etanólico bruto contiene 3,92 % de polifenoles totales y 0,11 % de flavonoides.¹³

Viuda (2007) evaluó la actividad antifúngica de los aceites esenciales de la toronja (*Citrus paradisi* L.), limón (*Citrus lemon* L.), mandarina (*Citrus reticulata* L.) y naranja (*Citrus sinensis* L.) sobre el crecimiento de mohos (*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium chrysogenum* y *Penicillium verrucosum*) utilizando el método de dilución en agar. Los aceites esenciales de los cítricos fueron obtenidos por presión en frío de la cáscara. La toronja fue el mejor inhibidor de los mohos *P. chrysogenum* y *P. verrucosum*.¹⁴

Sharma (2010) investigó las propiedades antimicrobianas de la combinación del extracto de *Citrus paradisi* y *Ficus carica* frente a *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *B. subtilis*, *M. luteus* y *Candida albicans* mediante el método de difusión en pozo. Los extractos de metanol, éter de petróleo, cloroformo, acetona, éter etílico y etanol de *Citrus paradisi* y *Ficus carica* fueron diluidos con DMSO hasta obtener concentraciones del 5, 10, 20, 50, 100, 200, 400 mg/mL. Las placas de agar fueron sembradas con 0,5 mL de cada bacteria y hongo, con un sacabocado de 6 mm de diámetro hicieron los pozos para luego depositar 100 µl de cada solución e incubar a 37°C por 24 horas. El extracto acuoso de *Citrus paradisi* y *Ficus carica* al 5, 10, 20, 50, 100, 200 y 400 % produjo halos de inhibición de 15, 17, 19, 21, 18, 24 y 19 mm respectivamente sobre las cepas de *C. albicans*. El tamizaje fitoquímico de los diferentes extractos mostró la presencia de alcaloides, taninos, saponinas, flavonoides, esteroides y glucósidos.¹⁵

Soto (2010) obtuvo el aceite esencial de las cortezas de toronjas por el método de hidrodestilación y lo caracterizó empleando las técnicas de Cromatografía de Gas (GC) con detección FID y Cromatografía de Gas-Espectrometría de Masa (GC-MS). Evaluó la actividad antimicrobiana del aceite esencial de toronja mediante la prueba de susceptibilidad Kirby-Bauer. Los diferentes componentes del aceite esencial fueron identificados según los tiempos de retención y los espectros de masa, identificando 38 componentes en el aceite esencial de toronja. El monoterpeno limoneno fue el componente más abundante 65,49 %. Los aldehídos se detectaron en proporciones de 2,45 %; mientras que los alcoholes en un 3,62 %. Los sesquiterpenos representaron la menor proporción de componentes, sin embargo el sesquiterpeno encontrado en mayor proporción fue el cariofileno con un 1,29 %. Todas las bacterias ensayadas *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella spp.*, fueron resistentes al aceite esencial de toronja.¹⁶

Uysal (2011) analizó la composición química del aceite esencial de la cáscara de *Citrus paradisi* obtenido por Extracción por microondas sin disolvente (SFME) e Hidrodestilación (HD). El aceite esencial fue analizado por Cromatografía de gases-Espectrometría de masas y se identificaron 25 componentes, resultando Limoneno como dominante (91,5 - 88,6 %) para los dos métodos de extracción SFME y HD respectivamente. β -pineno (0,8-1,2 %), linalool (1,1-0,7 %), α -terpinene (0,7-1,0 %) y los otros componentes menores fueron también detectados. Determinó las propiedades antibacterianas del aceite esencial de toronja por el método de difusión en disco. El aceite demostró amplio espectro antimicrobiano contra *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*,

Escherichia coli, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens* y *Proteus vulgaris*, con zonas de inhibición que van desde 11 a 53 mm.¹⁷

Faleye (2012) investigó la actividad antioxidante y antimicrobiana del extracto de semillas de *Citrus paradisi* “toronja” utilizando el método de difusión en agar contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa*. Las estructuras de los compuestos aislados se establecieron utilizando estudios de espectroscopía y fueron identificados como obacunona, nomilina, limonina y ácido nomilínico. Ninguno de los compuestos aislados mostró actividad antimicrobiana pero el ácido nomilínico mostró una débil propiedad antioxidante.¹⁸

Okunowo (2013) determinó la actividad antimicrobiana del aceite esencial de la cáscara de toronja sobre algunos aislamientos clínicos (*Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *E. coli* ATCC 25292, *Klebsellia pneumonia*, *Pseudococcus sp.*, *Salmonella typhmuri*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213) y aislados fúngicos (*Aspergillus niger*, *Candida albicans* y *Penicillium chrysogenum*), mediante el método de difusión en agar. La mezcla de aceite metanólico inhibió todas las bacterias y hongos. La mezcla de aceite de etanol inhibió las bacterias de ensayo y *C. albicans*, mientras que el extracto de aceite disuelto en solución de Tween 80 no mostró actividad inhibidora sobre los hongos de prueba. El análisis de Cromatografía de gases con espectrometría de masas indicó los componentes del aceite esencial siendo el más predominante D-limoneno (75,05 %).¹⁹

Soto (2013) estudió los componentes volátiles del aceite esencial de cortezas de toronja (*Citrus paradisi*) obtenido por el método de hidrodestilación. Determinó por las técnicas de Cromatografía de gas con detector fotométrico de llama (GC- FID) y Cromatografía de gas-espectrometría de masa (GC-MS) 50 compuestos los cuales fueron separados e identificados, el monoterpeno limoneno fue el componente más abundante de esta fracción con un 70,04 %. Los aldehídos se detectaron en proporciones de 6,32 %, mientras que los alcoholes en un 7,77 %, constituyendo los principales componentes en la fracción oxigenada. Los sesquiterpenos representaron la menor proporción, sin embargo, el sesquiterpeno encontrado en mayor proporción fue el (E)- cariofileno con un 1,64 %. El rendimiento fue de 2,07 mL de aceite por kg de corteza, que representa un rendimiento final de 0,30 mL de aceite esencial por kg de fruto.²⁰

Oikeh (2016) determinó la composición fitoquímica, actividad antimicrobiana y antioxidante de diferentes concentrados de zumos de cítricos. Los frutos de toronja (*Citrus paradisi*), mandarina, limón y lima fueron cortados en mitades y extraídos con un extractor de jugo. Evaluó la actividad antimicrobiana mediante el método de difusión en agar con pozos contra cinco bacterias (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Salmonella spp.*) y tres hongos (*Candida albicans*, *Aspergillus niger* y *Penicillium spp.*). El zumo de toronja a la concentración de 200 µl/mL mostró zonas de inhibición de 8 mm sobre cepas de *Candida albicans*, CMI (Concentración mínima inhibitoria) y CMF (Concentración mínima fungicida) de 25 y 50 µg/mL. En comparación con los otros cítricos, la toronja fue menos eficaz como agente antibacteriano y antifúngico, sin embargo tuvo una mejor actividad antioxidante.²¹

3.2 BASES TEÓRICAS

3.2.1 *Citrus paradisi* “toronja”

3.2.1.1 Clasificación sistémica^{22, 23}

La muestra vegetal fue clasificada en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, teniendo la siguiente clasificación taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988)

División : MAGNOLIOPHYTA
Clase : MAGNOLIOPSIDA
Subclase : ROSIDAE
Orden : SAPINDALES
Familia : RUTACEAE
Género : *Citrus*
Especie : *Citrus x paradisi* Macfad.
Nombre vulgar: “toronja”

3.2.1.2 Descripción y características morfológicas

Citrus paradisi es un árbol cuyo tronco es corto y de copa compacta, brotes color púrpura y pocas espinas. Las hojas son de tamaño intermedio, algo vellosas, con alas grandes, nervios muy marcados y olor típico. Las flores son grandes y color verdoso, tiene estambres reducidos. El fruto es un hesperidio de forma globular achatada de color amarillo claro y de grandes dimensiones, puede alcanzar un diámetro de 15 cm a 20 cm. Consta de exocarpo (flavedo: presenta vesículas que

contienen aceites esenciales), mesocarpio (albedo: pomposo y de color blanco) grueso y endocarpo (pulpa: presenta tricomas con jugo) blanco, rosa o rojo.^{24, 25}

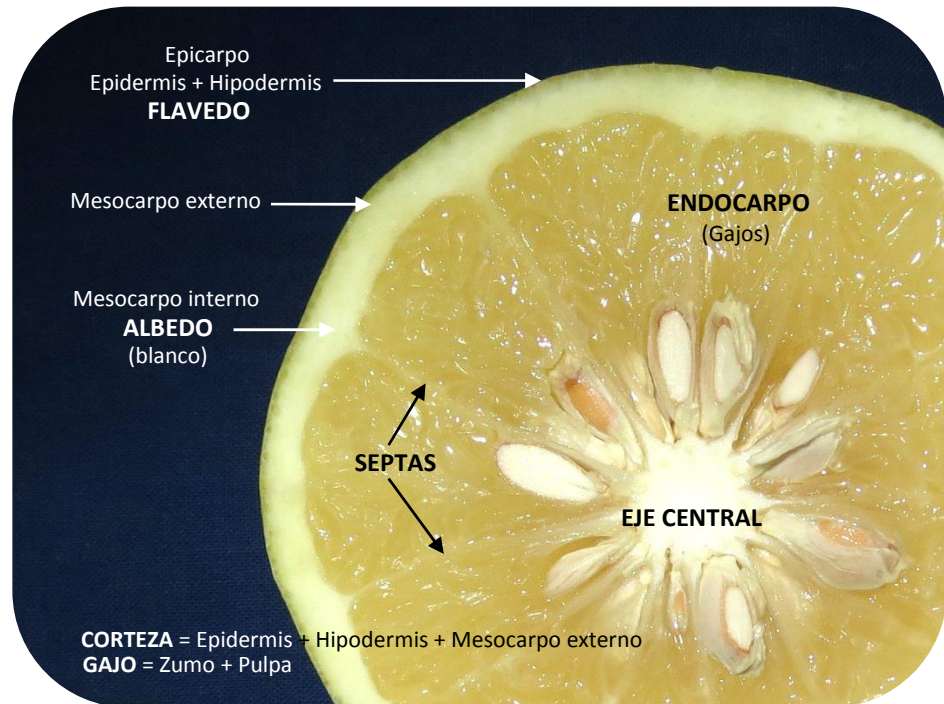


Figura 1. Partes de la toronja

3.2.1.3 Distribución y hábitat

El género *Citrus* tuvo su centro de origen en los trópicos y subtrópicos del este de Asia y del Archipiélago Indomalayo (China, Bután, Burma y Malasia), lugares en los cuales su cultivo comenzó hace miles de años. En el siglo XVI, desde España se trajeron cítricos al Perú, donde se inició su cultivo en el valle del Rimac y valles más al norte.

En el Perú, se distribuye en la Costa y Selva Central del país, puede encontrarse en departamentos como Ica y Lima.²⁶

La toronja es uno de los cítricos más sensibles al frío; las flores no resisten temperaturas inferiores a un grado bajo cero, por lo que su

cultivo se restringe a climas semi-tropicales, templados y a altitudes próximas al nivel del mar. Además, requiere suelos frescos, sueltos y bien drenados.²⁴

3.2.1.4 Usos y propiedades medicinales

La toronja se consume en jugo simple o concentrado; sus frutos son utilizados principalmente en la elaboración de zumos y pequeñas cantidades para mermeladas, tanto naturales como concentradas. Es utilizada como ingrediente de cosméticos, jabones y detergentes; de la cáscara se extrae aceites esenciales muy utilizados en la perfumería; además de ser considerado un insecticida idóneo.^{2, 27}

Dentro de las propiedades medicinales se puede mencionar que el zumo de toronja combate el letargo, la sequedad de la garganta y su olor estimula el hemisferio derecho, agudiza la memoria y la concentración.²⁴

Se le atribuye propiedades antibacterianas, antifúngicas, antiinflamatorias, antioxidantes, antivirales, astringentes y conservantes. La toronja también ha sido utilizada en la prevención del cáncer, regeneración celular, reducción del colesterol, desintoxicación, mantenimiento de la salud del corazón, lupus, nefritis, artritis reumatoide y pérdida de peso.²

3.2.1.5 Aceite esencial

Los aceites esenciales son sustancias orgánicas constituidas por terpenos, sesquiterpenos y compuestos aromáticos que se localizan en determinados órganos de la planta como flores, hojas y frutos. Son extraídos de las plantas, en su mayoría por destilación por arrastre con

vapor de agua dependiendo del método y la condición del vegetal, comportándose como líquidos miscibles en solventes orgánicos e inmiscibles en agua.²⁸

Los aceites esenciales se clasifican, según su consistencia en: esencias fluidas, bálsamos y oleorresinas; según su origen en: natural, artificial y sintético y de acuerdo con sus componentes mayoritarios en: monoterpénicos, sesquiterpénicos y fenilpropanoides.²⁹

3.2.1.6 Composición química del aceite esencial de *Citrus paradisi*

Los aceites esenciales obtenidos de frutos cítricos son mezclas de aproximadamente 100 componentes, los cuales dependen de la variedad de fruta y del método de extracción empleado, conteniendo de un 85 al 90 % de compuestos volátiles y de 1 al 15 % de compuestos no volátiles.^{30, 31}

El componente químico principal de los aceites de cítricos es limoneno, que se encuentra desde 32 hasta 98 %. Los constituyentes de los aceites esenciales son importantes para determinar la calidad y la composición cuantitativa de los aceites, que a su vez podría tener un efecto sobre el potencial antimicrobiano.^{16, 32}

Varios autores han atribuido la capacidad antifúngica de aceites esenciales de cítricos a la presencia de componentes, tales como el D-limoneno, linalol o citral, los cuales se encuentran presentes en diferentes concentraciones.¹⁴

Tabla 1. Perfil GC-MC de los componentes del aceite esencial de la cáscara de toronja (*Citrus paradisi*) obtenido por hidrodestilación¹⁹

Pico N°	Componente	Tiempo de retención (min)	Concentración (%)
1	Nonane ^a	5.707	0.20
2	α -pinene ^a	6.182	2.11
3	β -Phellandrene ^a	6.709	1.18
4	β -Myrcene ^a	6.983	7.25
5	Octanal ^c	7.144	1.68
6	D-limonene ^a	7.659	75.07
7	3-Carene ^a	7.836	0.21
8	Cis-Linaloloxide ^b	7.968	0.31
9	Linalool ^b	8.247	0.48
10	Decanal ^c	9.307	1.11
11	Tridecane ^d	10.18	0.26
12	Copaene ^e	10.983	0.82
13	Tetradecane ^d	11.075	0.47
14	Caryophyllene ^e	11.395	1.88
15	α -Caryophyllene ^e	11.687	0.30
16	δ -Cadinene ^e	12.236	0.89
17	Methyl palmitate ^f	16.505	0.31
18	Methyl oleate ^f	18.410	0.19
19	Phthalate ^f	22.090	0.54
	Total identificado		95.26
	(%)		
---	Otro	Varios	4.74
	Rendimiento (%)		0.79
	Gravedad específica		0.883

^a monoterpeno, ^b monoterpeno oxigenado, ^c aldehído alifático, ^d hidrocarburo alifático, ^e sesquiterpeno, ^f ácido esteárico, y ^g Otros hidrocarburos no identificados.

3.2.2 *Candida albicans*

El género *Candida* comprende aproximadamente a 154 especies, entre ellas, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. dublinensis*, son frecuentemente aisladas de infecciones en humanos.³¹ *C. albicans* es la especie más relevante por producir infecciones orales, comprende entre el 60 % y 70 % de los aislamientos de la cavidad oral.³⁴

Estas levaduras pueden encontrarse formando parte de la microbiota normal de la cavidad oral (lengua, paladar, mucosa oral), el tubo digestivo (estómago, intestino), la vagina, y en el ambiente.³⁵

3.2.2.1 Clasificación

Esta especie fúngica presenta la siguiente clasificación taxonómica: ^{36, 37}

- REINO : Fungi
- CLASE : Saccharomycetes
- ORDEN : Saccharomycetales
- FAMILIA : Saccharomycetaceae
- GENERO : *Candida*
- ESPECIE : *C. albicans*

3.2.2.2 Descripción

C. albicans es una levadura gram positiva, aerobia, gemante, capaz de desarrollar pseudofilamentos y producir clamidosporas (tipo de espora asexual).³⁷ Su diámetro varía entre 2-4 µm, de forma oval y paredes delgadas. Sus colonias son de tamaño mediano, húmedas, cremosas que tienen un olor dulzón y en medios de cultivos cromogénicos adoptan coloración verdeesmeralda.³⁶

3.2.2.3 Estructura celular

En la adhesión de *Candida* a distintas superficies juegan un papel primordial su membrana y sobre todo su pared celular. La membrana está constituida por una doble capa de diversos fosfolípidos entre los que destacan la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina, contiene también esteroides (ergosterol y zosterol). Esta membrana protege al citoplasma, regula la entrada y salida de solutos y facilita la síntesis de la pared celular.

La pared celular está compuesta en un 80 % al 90 % de hidratos de carbono y aproximadamente un 10 % de proteínas y glucoproteínas. Esta pared celular proporciona rigidez y fuerza, y protege a la membrana celular de un shock osmótico.

La membrana citoplasmática presenta una doble capa compuesta por lípidos, además de proteínas y carbohidratos en menor proporción. Los antibióticos y antimicóticos actúan a este nivel y contiene las enzimas responsables de la síntesis de la pared celular.

Su citoplasma presenta ribosomas, mitocondrias con doble capa, gránulos de glucógeno y vacuolas. Su núcleo tiene una membrana nuclear limitante, ADN y ARN y varios cromosomas.³⁶

3.2.2.4 Factores de virulencia

Los factores de virulencia son los que promueven la colonización e invasión en tejidos, haciendo que los microorganismos alcancen altos niveles de población antes que se vean limitadas por la respuesta del hospedero.³⁸

Adherencia

Las interacciones físicas de *C. albicans* con el hospedero son a nivel de la superficie celular, y las adhesinas que son los constituyentes proteicos de la pared celular de la levadura. *C. albicans* se adhiere a células epiteliales, células endoteliales, factores solubles, componentes de la matriz extra celular y materiales inertes implantados en el cuerpo del hospedero.³⁹

Hidrofobicidad de la pared celular

La hidrofobicidad de la superficie celular está relacionada con la adherencia de blastosporas de *Candida* a las células epiteliales humanas. Los cambios que suscitan en las proteínas de la capa externa de la pared celular de *C. albicans*, son los responsables de las variaciones hidrofóbicas a hidrofílicas en esta especie.⁴⁰

Hifas

La formación del tubo germinal y el incremento de la adherencia de *C. albicans* a las células epiteliales bucales. Durante la formación de las hifas, se producen proteinasas que ayudan a romper la integridad de la mucosa bucal.⁴¹

Enzimas

La Fosfolipasa A y la Lisofosfolipasa producidas por cepas de *C. albicans* firmemente adheridas a las células epiteliales bucales, tienen mayor actividad enzimática. Las proteinasas juegan un papel importante en la adherencia y en la invasión de *Candida* al epitelio bucal.⁴²

Bacterias de la cavidad bucal

Las bacterias contribuyen a la colonización y proliferación de especies de *Candida* en la cavidad bucal. La coagregación de *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus oralis* y *Streptococcus anginosus* con *C. albicans* se incrementa en ausencia de glucosa.⁴¹

Saliva

La presencia de saliva incrementa la adhesión de las formas de levadura de *C. albicans*, la saliva no posee solamente sustancias que inhiben el crecimiento microbiano, también tiene compuestos como las glicoproteínas del tipo mucinas que incrementan la capacidad de *Candida* de adherirse a la superficie del acrílico de las prótesis dentales, favoreciendo así la aparición de estomatitis subprotésica.⁴³

pH

El medio ambiente ácido favorece la colonización de la cavidad bucal por parte de especies de *Candida*. La reducción del pH salival, que habitualmente oscila entre 5,6 y 7,8; como ocurre bajo las prótesis dentales removibles, favorece la adhesión del hongo.⁴³

3.2.2.5 Identificación

Candida albicans crece en Agar-Dextrosa Sabouraud, formando colonias redondas, elevadas blanco-cremosas a 37°C por 48 horas. Existen varias pruebas específicas para identificar a *C. albicans*: prueba de Tubo germinativo, producción de clamidoconidios en agar harina de maíz, asimilación de carbohidratos con el Sistema API; entre ellas la más importante es la prueba de tubo germinativo que consiste en incubar la levadura en plasma humano o suero de conejo a 37°C durante 2 horas; sólo *C. albicans* formará tubo germinal en este periodo de tiempo. El tubo germinal es una extensión filamentosa de la levadura, de paredes paralelas, sin estrechamiento en su origen, cuyo ancho suele ser la mitad de la célula progenitora y su longitud tres o cuatro veces mayor que ésta. Sólo *Candida albicans* es capaz de producir verdaderos tubos germinativos; sin embargo, otras especies como *Candida tropicalis* pueden producir pseudohifas precoces de aspecto similar a los tubos germinativos pero de paredes paralelas y con una zona de constricción adyacente a la célula madre, por lo que esta característica es útil para diferenciar *C. albicans* del resto de las especies de *Candida*.^{43, 44}

3.2.3 Estomatitis subprotésica

La estomatitis subprotésica es un proceso inflamatorio de la mucosa bucal relacionado con prótesis removibles y cuyos parámetros fundamentales son el eritema y la inflamación de la mucosa.⁴⁵

Se observa con mayor frecuencia en mujeres, principalmente con localización maxilar, en la superficie del paladar en contacto con la prótesis dental y afecta principalmente a la población de edad avanzada.⁴⁶ Esta lesión tiene etiología multifactorial y ha sido asociada con la presencia de *Candida albicans* y otros microorganismos bucales.⁶

3.2.3.1 Clasificación

La estomatitis subprotésica ha sido clasificada desde el punto de vista clínico-patológico por Newton (1962) y Ostlund (1958) en tres tipos:⁴⁵

Tipo I

Presenta una inflamación de carácter focal de pequeña intensidad con un punteado rojizo, producido por la oclusión de los conductos excretores de las glándulas salivales menores. La inflamación tiene un carácter local y está limitada a un área de la mucosa palatina en relación con la prótesis. Este cuadro está estrechamente relacionado con el trauma protético.⁴⁵

Tipo II

Muestra una inflamación difusa con un enrojecimiento general en toda el área cubierta por la prótesis. Está asociado a diferentes factores

etiopatogénicos, siendo los más importantes el trauma protético y la infección por *Candida albicans*.⁴⁵

Tipo III

Presenta una intensa inflamación con hiperemia de la mucosa y un aspecto nodular en el área cubierta por la prótesis. El factor etiopatogénico es la *Candida albicans*, siempre en relación con el trauma protético acompañante.⁴⁵

Existe una modificación de la clasificación de Newton, descrita en el estudio de Kabawat y col; en la cual se presenta una subdivisión de la tipo I:⁴⁷

Tipo 0 : Mucosa saludable.

Tipo IA : Petequias en tejido palatino normal, usualmente se encuentra alrededor de los orificios de los ductos de glándulas mucosas palatinas.

Tipo IB : Área hiperémica localizada en la zona protésica.

Tipo II : Área generalizada de inflamación de la zona protésica.

Tipo III : Superficie palatina hiperplásica con inflamación en el área protésica.⁴⁷

3.2.3.2 Epidemiología

La estomatitis subprotésica es una enfermedad muy frecuente entre los portadores de prótesis removible y, dependiendo del autor, la prevalencia se cifra entre un 11 % y un 67 %.

La mayor parte de los trabajos realizados indican que la estomatitis subprotésica posee una mayor predilección por el género femenino.⁴⁸

3.2.3.3 Características clínicas

Empieza en forma de un punteado rojo diseminado, que progresivamente se torna más eritematoso y congestivo, para terminar con inflamación e incluso erosiones en la mucosa.⁴⁵

Habitualmente la estomatitis subprotésica es asintomática, se presenta en una minoría de los pacientes con dolor, prurito o sensación de ardor, en ocasiones describen únicamente halitosis, gusto desagradable y sequedad de boca.⁶ Esta alteración es diagnosticada principalmente durante el examen intraoral con la presencia de inflamación la mucosa oral cubierta por la prótesis.³⁷

3.2.3.4 Etiopatogenia

Las investigaciones consideran que la etiopatogenia de la estomatitis subprotésica es multifactorial. Entre los factores más significativos encontramos:

- Trauma protético ocasionado por el desajuste del aparato y los malos hábitos de utilización.
- Higiene de la prótesis donde se involucran elementos microbiológicos debido a la placa bacteriana subprotésica que conforma un especial ecosistema con características muy particulares en su pH, en el que influyen la dieta, características salivares, entre otros.
- Posibles reacciones alérgicas e irritación causada por los materiales que componen la prótesis (resinas o aleaciones metálicas).
- Infección candidiásica.
- Enfermedades sistémicas predisponentes.⁴⁹

3.3 DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS

Aceite esencial:

Los aceites esenciales son mezclas de varias sustancias químicas biosintetizadas por las plantas, que dan el aroma característico a algunas flores, árboles, semillas y a ciertos extractos de origen animal. Químicamente están formados por terpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, sustancias azufradas y nitrogenadas.⁵⁰

Halo de inhibición:

Zona alrededor de un pocillo embebido de una sustancia en el que no se produce crecimiento fúngico en una placa de agar sembrada con el microorganismo.⁵¹

Principio Activo:

Sustancia química pura (aislada de la droga) responsable de la actividad farmacológica y del uso terapéutico que se le atribuye a una droga.⁵²

3.4 HIPÓTESIS Y VARIABLES

Hipótesis

El aceite esencial de *Citrus paradisi* “toronja” presenta actividad antifúngica *in vitro* sobre cepas de *Candida albicans* aislados de estomatitis subprotésica.

Variables

Variable independiente:

Aceite esencial de *Citrus paradisi*

Cepas de *Candida albicans*

Variable dependiente: Actividad antifúngica (halo de inhibición)

Variables de control:

Control positivo: Clorhexidina 0,12 %

Control negativo: Dimetilsulfóxido DMSO (diluyente del aceite)

3.5 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Actividad antifúngica del <i>Citrus paradisi</i> “toronja” sobre <i>Candida albicans</i> aislados de estomatitis subprotésica					
Variable	Definición	Dimensión	Indicador	Escala	Categoría
Aceite esencial de <i>Citrus paradisi</i>	Sustancia extraída de la cáscara de <i>Citrus paradisi</i> “Toronja”	Grado de concentración del aceite esencial de <i>Citrus paradisi</i>	Cantidad de aceite esencial de <i>C. paradisi</i> diluido en DMSO	Cuantitativa Ordinal	Aceite 25 %
					Aceite 12,5 % Aceite 6,25 % Aceite 3,13 % Aceite 1,56 % Aceite 0,78 % Aceite 0,39 %
Cepa de <i>Candida albicans</i>	Levadura presente en la cavidad bucal	---	Crecimiento en medio de cultivo	Cualitativa nominal	Cepas obtenidas de pacientes con estomatitis subprotésica
Actividad antifúngica sobre <i>C. albicans</i>	Acción de determinadas sustancias químicas capaces de inhibir en pequeñas cantidades los procesos vitales de ciertos microorganismos	Grado de susceptibilidad antifúngica	Halos de inhibición medidos en milímetros	Cuantitativa Razón	
					S. Nula (-) < 8mm
					S. límite 9-14 mm
			Sensibilidad	Cualitativa Ordinal	S. media 15-19 mm
					S. sensible ≥20mm

Durauffourd y Lapraz,⁵³ considera la actividad de los aceites esenciales como:

- Nula (-) si fue inferior o igual a 8 mm
- Sensibilidad límite (Sensible=+) de 9 a 14 mm
- Sensibilidad media (muy sensible =++) de 15 a 19 mm
- Sumamente sensible (S.S.=+++) si fue igual o superior a 20 mm

IV. METODOLOGÍA

4.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN

Experimental: se valorará el efecto de una o más variables, donde el investigador manipulará las condiciones de la investigación que será llevada a cabo *in vitro*.

Prospectivo: los datos se analizarán transcurrido un determinado tiempo en el futuro.

4.2 POBLACIÓN Y MUESTRA

Cepa de *Candida albicans* obtenida a partir de hisopado de mucosa oral de 3 pacientes con diagnóstico de estomatitis subprotésica.

El aceite esencial de *Citrus paradisi* “toronja” en diferentes concentraciones.

4.3 PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS

4.3.1 Recolección de *Citrus paradisi* y Clasificación Taxonómica

Se recolectaron y seleccionaron los frutos de toronja en estado de madurez, coloración amarilla y no lesionados.

La clasificación taxonómica de la especie vegetal, se realizó en el Museo de la Historia Natural de la UNMSM (Figura 6).

4.3.2 Extracción del aceite esencial de la cáscara de *Citrus paradisi*

Los frutos de *C. paradisi* fueron transportados a las instalaciones del Laboratorio de Química Orgánica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, donde se realizó la extracción del aceite esencial.

Los frutos de toronja fueron pelados manualmente utilizando un cuchillo afilado de acero inoxidable; las tiras finas obtenidas de su cáscara se almacenaron en bolsas con cierre hermético donde se mantuvieron bajo refrigeración hasta su posterior utilización.¹⁶

El procedimiento para llevar acabo la extracción del aceite esencial se realizó en un sistema de hidrodestilación con arrastre de vapor de agua.

El destilado del aceite esencial fue recibido en un embudo de decantación, aquí se observó un estado difásico entre agua y aceite esencial.²⁰ Luego de decantado, el aceite esencial fue deshidratado utilizando sulfato de sodio anhidro.¹⁰ El aceite se depositó en un frasco de vidrio de color ámbar bajo refrigeración a temperatura de 4°C.¹⁹

El aceite esencial de *C. paradisi* fue transportado a las instalaciones del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos para la investigación microbiológica.

4.3.3 Dilución del aceite

El aceite esencial extraído fue diluido con Dimetilsulfóxido (DMSO) obteniéndose concentraciones distintas: 25; 12,5; 6,25; 3,13; 1,56; 0,78 y 0,39 %.

4.3.4 Recolección de muestras de *Candida albicans*

Pacientes

Se seleccionaron tres pacientes diagnosticados con estomatitis subprotésica de la Clínica Odontológica de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Toma de muestra, crecimiento y reconstitución de cepas de *Candida albicans*:

Las muestras para el aislamiento de cepas de *Candida albicans* se obtuvieron de pacientes diagnosticados con estomatitis subprotésica, se realizó un frotis con hisopo estéril humedecido con suero fisiológico de la zona donde presentaban la lesión cada uno de los pacientes elegidos.

Se sembró la muestra en agar Sabouraud y se incubó a 37 °C por 24 a 48 horas en condiciones de aerobiosis para su posterior identificación.

4.3.5 Procesamiento de la muestra

Aislamiento e identificación de *Candida albicans*

Se realizó la descripción y lectura de colonias, observándose colonias redondas, convexas, elevadas y de color blanco- cremosas.

Se tomó una de las colonias aisladas y definidas y se hizo la resiembra en Agar Dextrosa Sabouraud para luego incubar a 37°C por 24 horas. Posteriormente se hizo la identificación de *Candida albicans* por medio de la prueba de Tubo germinativo.

Prueba de Tubo germinativo para identificación de *Candida albicans*

Se suspendió el inóculo en un tubo conteniendo 0.5 mL de suero humano o de conejo. Se incubó a 35 °C por 2 horas.

Luego se colocó 1 gota de la emulsión para realizar un extendido en una lámina portaobjetos, colocar un cubre-objetos y se observó al microscopio con objetivo de x100, x400 ó x1.000. La prueba es positiva al visualizar la formación del tubo germinal, que es una estructura elongada que se origina a partir de la levadura. De ser positivo se confirma la presencia de *Candida albicans*.^{44, 54}

4.3.6 Prueba de sensibilidad antifúngica

Método de Difusión en Agar (Actividad antifúngica):

Fundamento: Esta prueba se basa en la inhibición del crecimiento fúngico, mediante la difusión de las sustancias activas en un medio sólido la que se evidencia con la formación de halos de inhibición.⁵⁵

Preparación del inóculo

Se prepararon los inóculos tomando con un asa de Kohle, bajo condiciones estériles, una “asada” de las colonias de cada cepa reactivada de *Candida albicans* de estomatitis subprotésica para luego suspenderla en 5 mL de solución salina 0,9 % en un tubo de ensayo hasta llegar a una concentración equivalente al grado de turbidez del tubo N° 0,5 de la escala de McFarland (donde el número de microorganismos es de $1-1,5 \times 10^8$ UFC/mL.)

Siembra de las muestras

Se utilizó el método de difusión en agar, el medio de cultivo que se utilizó fue agar Sabouraud. A cada placa se agregó 100 µl de la muestra estandarizada con micropipeta y se hizo la siembra por disseminación con un hisopo estéril tratando de no dejar ninguna parte de la superficie libre del inóculo, se dejó de 3-5 minutos para el secado.

Se obtuvieron 12 placas petri con las cepas de *Candida albicans*.

Se rotuló con un plumón indeleble los 10 espacios de cada placa los cuales correspondieron al aceite esencial de *Citrus paradisi* al 25; 12,5; 6,25; 3,13; 1,56; 0,78 %, control positivo (Clorhexidina 0.12 %) y control negativo (Dimetilsulfóxido).

Incorporación de la muestra e incubación del inóculo

Posteriormente con ayuda de un sacabocado estéril de 6mm de diámetro se hicieron 10 pozos en cada placa los cuales tuvieron una altura de 5mm para luego ser depositado 50 µL de cada concentración del aceite y los controles. Luego se dejó en reposo por una hora, esto con la intención de permitir una mejor difusión de la muestra en el agar. Posteriormente las 12 placas petri fueron llevadas a incubación a 37 °C por 48 horas.

Lectura de resultados

Luego de 48 horas de incubación se realizó la lectura con la observación de la presencia de halos de inhibición de crecimiento y posteriormente se procedió a tomar la medida del diámetro de estos en milímetros, lo cual indicó la mayor o menor sensibilidad de la *Candida albicans* al aceite esencial de *Citrus paradisi* a las concentraciones del 25; 12,5; 6,25; 3,13; 1,56; 0,78 y 0,39 %.

4.4 PROCESAMIENTO DE DATOS

Los datos de la investigación fueron registrados en un instrumento de recolección de datos por el investigador (Tabla 7).

El instrumento de recolección tuvo los siguientes datos:

1. Identificación de la muestra
2. Identificación de la concentración utilizada
3. Medida en milímetros del halo de inhibición formado

4.5 ANÁLISIS DE RESULTADOS

El análisis de resultados se realizó en una computadora CORE i5, Sistema Operativo Windows 8 con el programa SPSS versión 22.

Los datos fueron procesados aplicándose los intervalos de confianza al 95 %. Para interpretar los resultados obtenidos en la investigación se compararon estos utilizando el método de análisis estadístico: medias de tendencia central y dispersión; tales como el promedio, máximo, mínimo y desviación estándar. Para determinar el nivel de significancia de los resultados ($p < 0,05$) se utilizaron las pruebas estadísticas de Kruskal – Wallis, U Mann – Whitney y Chi -- cuadrado.

V. RESULTADOS

Se realizaron 12 ensayos válidos para cada concentración del aceite esencial de *Citrus paradisi* “toronja”, donde se obtuvieron los resultados observados en la Figura 2. Las mediciones de los halos de inhibición fueron registradas en la ficha de recolección de datos, que se observa en la Tabla 2.

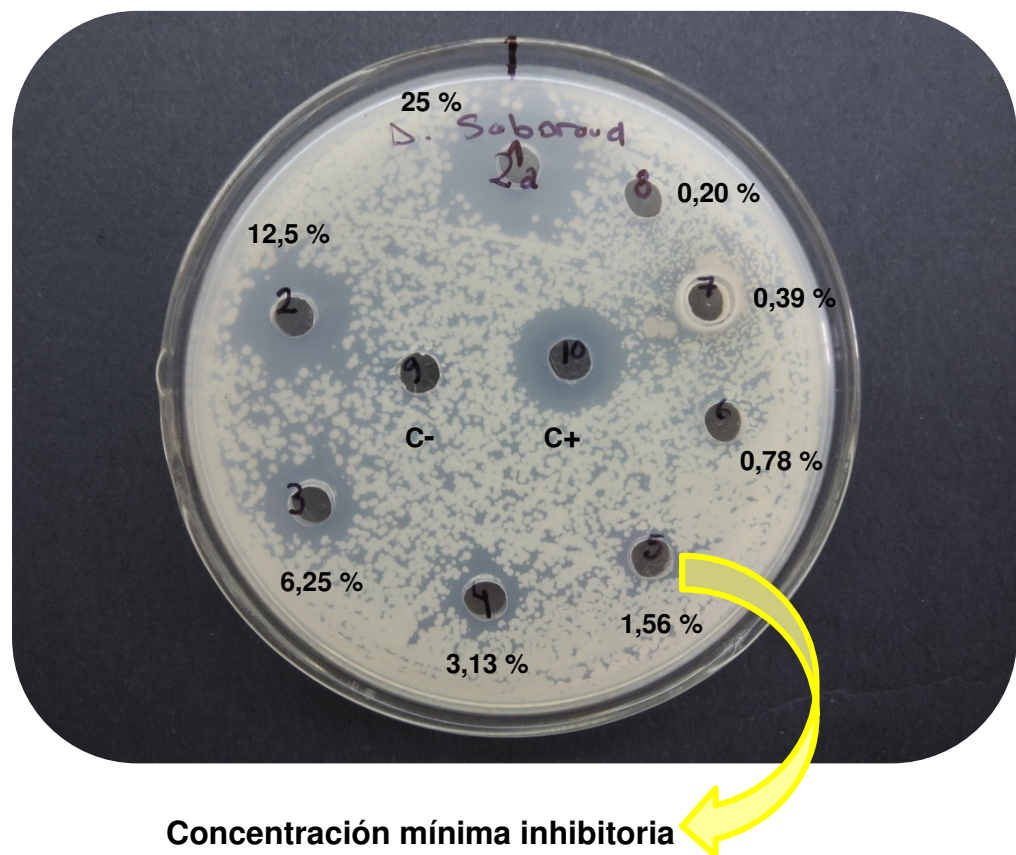


Figura 2. Formación de halos de inhibición en *Candida albicans* aislada de estomatitis subprotésica

Tabla 2. Mediciones de los halos de inhibición

	Concentración del aceite esencial de <i>Citrus paradisi</i>							CHx 0,12 %	DMSO	CMI
	25 %	12,5 %	6,25 %	3,13 %	1,56 %	0,78 %	0,39 %	C (+)	C (-)	[]
Placa N°1	11	9	8,5	7	6,5	6	6	12	6	1,56 %
Placa N°2	12,5	12	9	7,5	6	6	6	15,5	6	3,13 %
Placa N°3	17	15	12,5	9,5	8	6	6	16	6	1,56 %
Placa N°4	14	11	8	6,5	6,5	6	6	14,5	6	1,56 %
Placa N°5	12	11	8,5	7,5	6,5	6	6	12	6	1,56 %
Placa N°6	10	8,5	7	6	6	6	6	11	6	6,25 %
Placa N°7	12	8	6	6	6	6	6	11	6	12,5 %
Placa N°8	14	10,5	6	6	6	6	6	16	6	12,5 %
Placa N°9	11	8,5	6	6	6	6	6	12	6	12,5 %
Placa N°10	12	9	6	6	6	6	6	15,5	6	12,5 %
Placa N°11	13	10,5	8	7	6	6	6	14	6	3,13 %
Placa N°12	13	11	8	6	6	6	6	14	6	6,25 %
CMI promedio:										6,25 %

Los valores de halos de inhibición incluyen tamaño de pozo 6 mm.

La Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial de *Citrus paradisi* “toronja” frente a *Candida albicans* se encuentra en un rango de 1,56 % a 12,5 % y su media es 6,25 %.

Con los datos obtenidos se procedió al análisis estadístico de la siguiente manera:

Se realizó el análisis de normalidad para los halos de inhibición de cada una de las concentraciones con la finalidad de demostrar que estos tienen una distribución normal ($p > 0,05$) al 95 % de nivel de confianza. Se

encontró que el aceite esencial de *Citrus paradisi* “toronja” en concentraciones del 25; 12,5 % y Clorhexidina al 0,12 % presentan distribución normal, mientras que la concentración del aceite al 6,25; 3,13; 1,56; 0,78; 0,39 % y Dimetilsulfóxido no presentan distribución normal ($p < 0,05$).

5.1 ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL ACEITE ESENCIAL DE *CITRUS PARADISI* “TORONJA” SOBRE *CANDIDA ALBICANS*

Tabla 3. Halos de inhibición promedio según diferentes concentraciones del aceite

Concentración del aceite esencial	N°	Media (mm)	Desviación estándar	Intervalo de confianza	
				Límite inferior	Límite superior
25 %	12	12,63	1,82	11,46	13,78
12,5 %	12	10,33	1,94	9,09	11,57
6,25 %	12	7,79	1,86	6,60	8,97
3,13 %	12	6,75	1,05	6,08	7,42
1,56 %	12	6,29	0,58	5,92	6,66
0,78 %	12	6	0,00	-----	-----
0,39 %	12	6	0,00	-----	-----
Clorhexidina 0,12 %	12	13,63	1,93	12,40	14,85

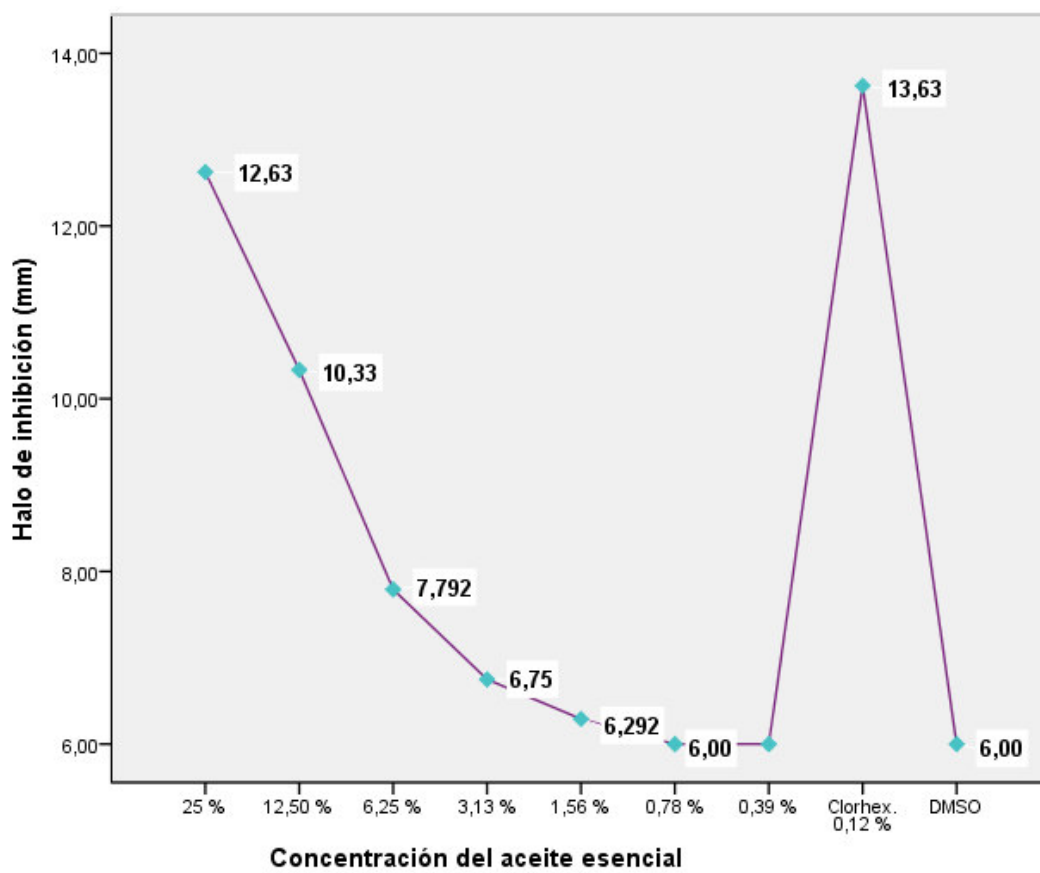


Figura 3. Halos de inhibición promedio según diferentes concentraciones del aceite

Los halos de inhibición de mayor diámetro se presentaron en la concentración del aceite al 25 %, con una media de 12,63 mm; le sigue la concentración del aceite al 12,5 %, con una media de 10,33 mm; la concentración del aceite al 6,25 %, con una media de 7,79 mm; la concentración del aceite al 3,13 %, con una media de 6,75 mm; por último, la concentración del aceite al 1,56 % presentó los halos de inhibición de menor tamaño, con una media de 6,29 mm. Las concentraciones del aceite al 0,78 y 0,39 % no presentaron halo de inhibición sobre la cepa de *Candida albicans*, los 6 mm indica el diámetro de los pozos.

La Clorhexidina al 0,12 % presentó halos de inhibición de mayor diámetro que el aceite esencial al 25 %, con una media de 13,62 mm.

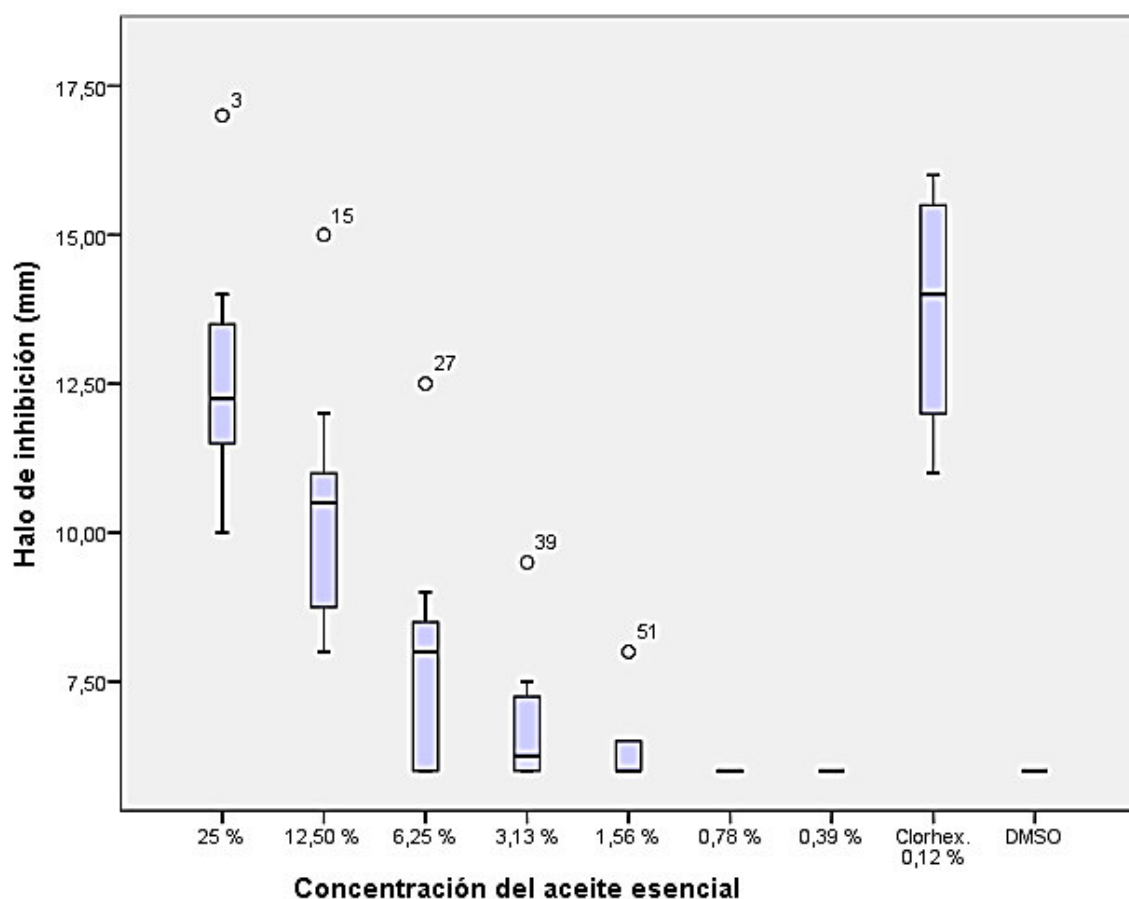


Figura 4. Halos de inhibición promedio según diferentes concentraciones del aceite

Los halos de inhibición de mayor diámetro se presentaron en la concentración del aceite al 25 %, con una mediana de 12,25 mm; le sigue la concentración del aceite al 12,5 %, con una mediana de 10,5 mm; la concentración del aceite al 6,25 %, con una mediana de 8 mm; la concentración del aceite al 3,13 % con una mediana de 6,25 mm; por último, la concentración del aceite al 1,56 % con una mediana de 6 mm. Las concentraciones del aceite al 0,78 y 0,39 % no presentaron halo de inhibición sobre la cepa de *Candida albicans*, los 6 mm indica el diámetro de los pozos.

La Clorhexidina al 0,12 % presentó halos de inhibición de mayor diámetro que el aceite esencial al 25 %, con una mediana de 14 mm.

5.2 COMPARACIÓN DEL EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE *CITRUS PARADISI* “TORONJA” EN DIFERENTES CONCENTRACIONES SOBRE EL CRECIMIENTO DE *CANDIDA ALBICANS*

Dado que algunas concentraciones del aceite no presentaron distribución normal, se realizó el análisis estadístico de variables cuantitativas la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis para comparación de más de dos medianas.

Luego de realizar la prueba de Kruskal Wallis se obtuvo $p(0,00) < 0.05$ se observó que existe diferencia estadísticamente significativa entre las 7 concentraciones del aceite, Clorhexidina al 0,12 % y DMSO.

Para evaluar entre quienes existen diferencias significativas, se comparó por pares de medianas utilizando la prueba de U de Mann Whitney entre las 7 concentraciones del aceite, Clorhexidina al 0,12 % y DMSO, se obtuvo:

Tabla 4. Prueba de U de Mann Whitney para comparación de dos concentraciones del aceite esencial

Aceite esencial	Significancia	
25 % vs 12,5 %	$p(0,005) < 0,05$	Significativo
25 % vs 6,25 %	$p(0,000) < 0,05$	Significativo
25 % vs 3,13 %	$p(0,000) < 0,05$	Significativo
25 % vs 1,56 %	$p(0,000) < 0,05$	Significativo
25 % vs 0,78 %	$p(0,000) < 0,05$	Significativo
25 % vs 0,39 %	$p(0,000) < 0,05$	Significativo
12,5 % vs 6,25 %	$p(0,003) < 0,05$	Significativo
12,5 % vs 3,13 %	$p(0,000) < 0,05$	Significativo
12,5 % vs 1,56 %	$p(0,000) < 0,05$	Significativo
12,5 % vs 0,78 %	$p(0,000) < 0,05$	Significativo
12,5 % vs 0,39 %	$p(0,000) < 0,05$	Significativo
6,25 % vs 3,13 %	$p(0,118) > 0,05$	No significativo
6,25 % vs 1,56 %	$p(0,020) < 0,05$	Significativo
6,25 % vs 0,78 %	$p(0,001) < 0,05$	Significativo
6,25 % vs 0,39 %	$p(0,001) < 0,05$	Significativo
3,13 % vs 1,56 %	$p(0,258) > 0,05$	No significativo
3,13 % vs 0,78 %	$p(0,006) < 0,05$	Significativo
3,13 % vs 0,39 %	$p(0,006) < 0,05$	Significativo
1,56 % vs 0,78 %	$p(0,033) < 0,05$	Significativo
1,56 % vs 0,39 %	$p(0,033) < 0,05$	Significativo
0,78 % vs 0,39 %	$p(1,000) > 0,05$	No significativo

El resultado de la prueba no paramétrica de U de Mann Whitney nos muestra que existe diferencia estadísticamente significativa entre la concentración al 25 % y las concentraciones menores.

Existe diferencia estadísticamente significativa entre la concentración al 12,5 % y las concentraciones menores.

Existe diferencia estadísticamente significativa entre las concentraciones al 6,25 % y las concentraciones menores excepto con la concentración al 3,13 %. El aceite esencial al 6,25 % presentó un halo de inhibición promedio de 7,79 mm, mientras que el aceite esencial al 3,13 % presentó un halo de inhibición promedio de 6,75 mm, se determinó que no existe diferencia estadísticamente significativa

Existe diferencia estadísticamente significativa entre las concentraciones al 3,13 % y las concentraciones menores excepto con la concentración al 1,56 %. El aceite esencial al 3,13 % presentó un halo de inhibición promedio de 6,75 mm, mientras que el aceite esencial al 1,56 % presentó un halo de inhibición promedio de 6,29 mm, se determinó que no existe diferencia estadísticamente significativa.

Existe diferencia estadísticamente significativa entre las concentraciones al 1,56 % y las concentraciones menores.

El aceite esencial al 0,78 y 0,39 % no presentaron halos de inhibición sobre la cepa de *Candida albicans*, los 6 mm indica el diámetro de los pozos, se determinó que no existe diferencia estadísticamente significativa.

5.3 COMPARACIÓN DEL EFECTO DE LA CLORHEXIDINA AL 0,12% Y EL ACEITE ESENCIAL DE *CITRUS PARADISI* “TORONJA”

Tabla 5. Prueba de U de Mann Whitney para comparación de Clorhexidina al 0.12 % con las concentraciones del aceite esencial

Grupos	Significancia	
Clorhex. vs 25 %	p(0,231) > 0,05	No significativo
Clorhex. vs 12,5 %	p(0,001) < 0,05	Significativo
Clorhex. vs 6,25 %	p(0,000) < 0,05	Significativo
Clorhex. vs 3,13 %	p(0,000) < 0,05	Significativo
Clorhex. vs 1,56 %	p(0,000) < 0,05	Significativo
Clorhex. vs 0,78 %	p(0,000) < 0,05	Significativo
Clorhex. vs 0,39 %	p(0,000) < 0,05	Significativo

Se utilizó la prueba de U de Mann Whitney para comparar las medias del halo de inhibición entre Clorhexidina al 0,12 % y cada una de las concentraciones del aceite esencial de *Citrus paradisi*, se determinó que existe diferencia estadísticamente significativa entre la Clorhexidina al 0,12 % y todas las concentraciones del aceite esencial a excepción del aceite al 25 %.

La Clorhexidina al 0,12 % presentó un halo de inhibición promedio de 13,63 mm, mientras que el aceite esencial de *Citrus paradisi* al 25 % presentó un halo de inhibición promedio de 12,63 mm, se determinó que no existe diferencia estadísticamente significativa.

5.4 EFECTO ANTIFÚNGICO DEL ACEITE ESENCIAL DE *CITRUS PARADISI* SOBRE *CANDIDA ALBICANS* SEGÚN LA ESCALA DE DURAFFOURD

Tabla 6. Actividad antifúngica del aceite esencial de *Citrus paradisi* sobre *Candida albicans*

Halo de inhibición	Concentración del aceite esencial de <i>Citrus paradisi</i>							CHx 0,12 %	DMSO
	25 %	12,5 %	6,25 %	3,13 %	1,56 %	0,78 %	0,39 %	C (+)	C (-)
	n n %	n n %	n n %	n n %	n n %	n n %	n n %	n n %	n n %
Sensibilidad nula (-)	0 0 %	1 8,33 %	8 66,66 %	11 91,66 %	12 100 %	12 100 %	12 100 %	0 0 %	12 0 %
Sensibilidad límite (+)	11 91,66 %	10 83,33 %	4 33,33 %	1 8,33 %	0 0 %	0 0 %	0 0 %	7 58,33 %	0 0 %
Sensibilidad media (++)	1 8,33 %	1 8,33 %	0 0 %	0 0 %	0 0 %	0 0 %	0 0 %	5 41,66 %	0 0 %
Sumamente sensible (+++)	0 0 %	0 0 %	0 0 %	0 0 %	0 0 %	0 0 %	0 0 %	0 0 %	0 0 %
Total	12 100 %	12 100 %	12 100 %	12 100 %	12 100 %	12 100 %	12 100 %	12 100 %	12 100 %
Chi cuadrado: p (0,00) < 0,05									

Duraffourd y Lapraz⁵³, considera la actividad de los aceites esenciales como:

- Nula (-) si fue inferior o igual a 8 mm
- Sensibilidad límite (Sensible=+) de 9 a 14 mm
- Sensibilidad media (muy sensible = ++) de 15 a 19 mm
- Sumamente sensible (S.S.= +++) si fue igual o superior a 20 mm

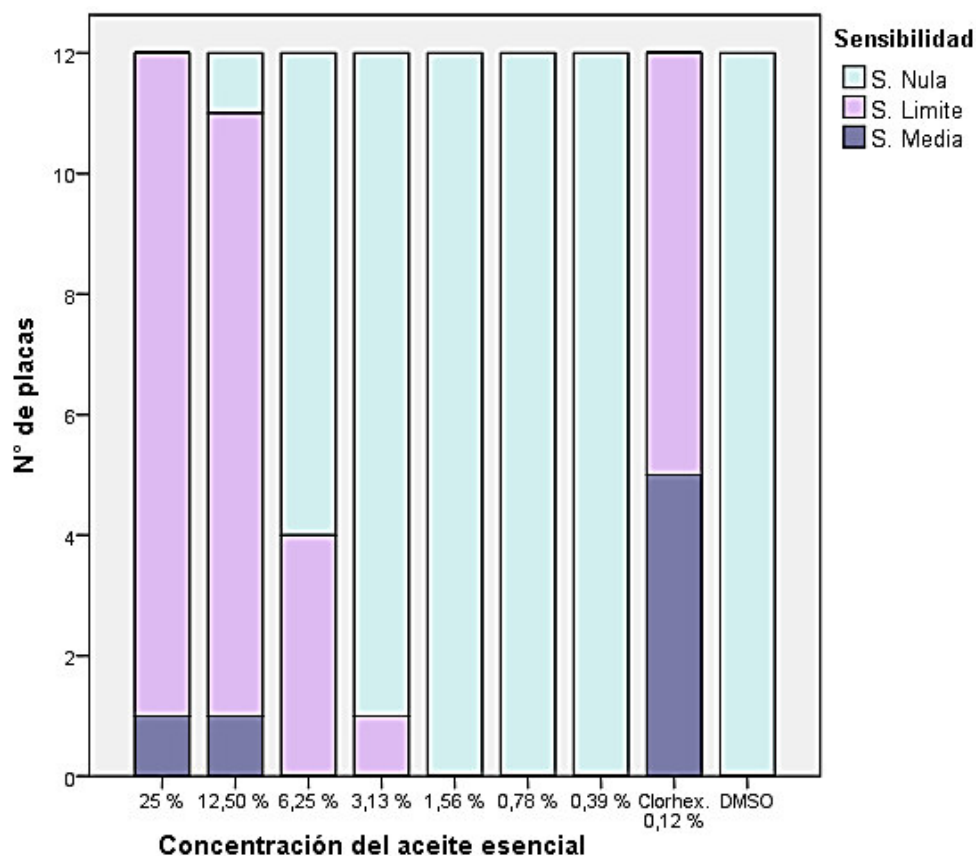


Figura 5. Actividad antifúngica del aceite esencial de *Citrus paradisi* sobre *Candida albicans*

Se organizó los resultados según la escala de medición de Duraffourd, en el que se obtuvo que para la concentración del 25 % del aceite esencial de *Citrus paradisi*, en el 91,66 % de los casos, los halos de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* superaron los 9 mm; y en el 8,33 % de los casos la longitud de los halos superaron los 15 mm, lo que indica una actividad antifúngica límite (sensibilidad límite).

La concentración del 12,5 % del aceite esencial de *Citrus paradisi*, en el 83,33 % de los casos, los halos de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* superaron los 9 mm; en el 8,33 % de los casos la longitud de los halos superaron los 15 mm y en el 8,33 % de los casos, los halos no

superaron los 8mm, lo que indica una actividad antifúngica límite (sensibilidad límite).

La concentración del 6,25 % del aceite esencial de *Citrus paradisi*, en el 33,33 % de los casos, los halos de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* superaron los 9 mm; y en el 66,66 % de los casos la longitud de los halos no superaron los 8 mm, lo que indica una actividad antifúngica nula (sensibilidad nula).

La concentración del 3,13 % del aceite esencial de *Citrus paradisi*, en el 8,33 % de los casos, los halos de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* superaron los 9 mm; y en el 91,66 % de los casos, los halos no superaron los 8 mm, lo que indica una actividad antifúngica nula (sensibilidad nula).

La concentración del 1,56; 0,78 y 0,39 % del aceite esencial de *Citrus paradisi*, en el 100 % de los casos, los halos de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* no superaron los 8 mm, lo que indica una actividad antifúngica nula (sensibilidad nula).

La Clorhexidina al 0,12 %, en el 41,77 % de los casos, los halos de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* superaron los 15 mm; y en el 58,33 % de los casos la longitud de los halos superaron los 9 mm, lo que indica una actividad antifúngica límite (sensibilidad límite).

.

Se realizó la prueba de Chi cuadrado donde se obtuvo $p(0,00) < 0,05$ lo cual indica que existe diferencia estadísticamente significativa.

VI. DISCUSIÓN

Actualmente se investigan numerosas plantas con la finalidad de encontrar en ellas compuestos antimicrobianos que luego puedan ser utilizados medicinalmente. *Citrus paradisi* “toronja” es una planta que se utiliza en la medicina tradicional por sus múltiples propiedades.

La presente investigación demostró la actividad antifúngica *in vitro* del aceite esencial de *Citrus paradisi* sobre *Candida albicans*, evaluado mediante la prueba de difusión en Agar con pozos.

A pesar que esta especie vegetal es poco conocida científicamente, ha sido estudiada por algunos investigadores.

Diferentes métodos han sido utilizados por los investigadores para medir la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales. La presente investigación determinó la actividad antifúngica del aceite esencial de *Citrus paradisi*, a concentraciones del 25; 12,5; 6,25; 3,13 y 1,56 %, sobre cepas de *Candida albicans* con halos de inhibición promedio de 12,63; 10,33; 7,79; 6,75 y 6,29 mm. Las concentraciones del aceite esencial al 0,78 y 0,39 % no presentaron actividad antifúngica sobre las cepas de *Candida albicans*. Estos resultados difieren a los reportados por Flores¹⁰ que no encontró actividad antifúngica del aceite esencial de toronja al 1,0 mg/mL sobre cepas de *Candida albicans*, pero si actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, posiblemente la diferencia de estos resultados se deba al diluyente utilizado; Flores¹⁰ utilizó el medio de cultivo para obtener las diferentes concentraciones, mientras en la presente investigación se utilizó el Dimetilsulfóxido. Asimismo, Oikeh²¹ encontró actividad antifúngica del zumo de toronja a

la concentración de 200 µg/mL sobre cepas de *Candida albicans* con zonas de inhibición de 8mm cuyos resultados son similares a los obtenidos en esta investigación.

En la tabla 4 se muestra la comparación de la actividad antifúngica de las concentraciones del aceite esencial de *Citrus paradisi* frente a cepas de *Candida albicans*, según los análisis estadísticos realizados las levaduras mantuvieron un mismo comportamiento de inhibición de crecimiento a las concentraciones de 6,25; 3,13 y 1,56 %. De esta manera, se observó que el comportamiento de *Candida albicans*, no mostró diferencias significativas ($p > 0,05$) al comparar las concentraciones de aceite esencial entre 6,25 y 3,13 %, lo cual podría indicar que la concentración más baja (3,13 %) tendría el mismo efecto inhibitorio que la concentración al 6,25 %. Similarmente ocurre en las concentraciones de 3,13 % y 1,56 %, en la cual una concentración de 3,13 % sería igualmente efectiva que la de 1,56 %.

En la tabla 5 se muestra la comparación de la actividad antifúngica de las concentraciones del aceite esencial con la Clorhexidina al 0,12 % frente a cepas de *Candida albicans*. Según los análisis estadísticos realizados, se observó que el comportamiento de inhibición de crecimiento de *Candida albicans*, no mostró diferencia significativa ($p < 0,05$) al comparar la concentración de aceite esencial al 25 % con la Clorhexidina al 0,12 %, lo cual podría indicar que el aceite esencial al 25 % tendría el mismo efecto inhibitorio que la Clorhexidina al 0,12 %.

Según la escala de medición de Duraffourd, se obtuvo que el aceite esencial de *Citrus paradisi* al 25 y 12,5 % tuvo una actividad antifúngica límite (sensibilidad +: halos de inhibición de 9mm a 14mm) sobre cepas

de *Candida albicans* y el aceite esencial a las concentraciones de 6,25; 3,13; 1,56; 0,78 y 0,39 % tuvo una actividad antifúngica nula (sensibilidad - : halos de inhibición menor a 8 mm). Estos resultados son similares a los obtenidos por Uysal¹⁶ que evaluó la actividad antibacteriana del aceite esencial de toronja contra *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens* y *Proteus vulgaris*, con zonas de inhibición que van desde 11 a 53 mm; lo cual indica una actividad antibacteriana límite a sumamente sensible.

La Concentración mínima inhibitoria (CMI) promedio de *Candida albicans* a las diferentes concentraciones del aceite esencial analizado fue de 6,25 % (tabla 2). Este valor determina la menor concentración del aceite esencial en la cual *C. albicans* resulta ser inhibida. Este hallazgo no se puede comparar con otros estudios pues es un trabajo pionero en la búsqueda de la CMI del aceite esencial de la cáscara de *Citrus paradisi*. Sin embargo, estudios similares como el de Cvetnic¹³ que determinó la CMI del extracto etanólico de semilla y pulpa de toronja, siendo el valor de CMI para *C. albicans* 8,25 % m/v, el cual fue superior al obtenido en el presente trabajo con un valor de 6,25 %. Estos resultados son inferiores a los reportados por Oikeh²¹, quien determinó la actividad antifúngica del zumo de toronja sobre cepas de *Candida albicans* con una CMI de 25 µg/mL.

Uysal¹⁷ encontró por medio del método de difusión en disco, que el aceite esencial de la cáscara de toronja tiene actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Serratia*

marcescens y *Proteus vulgaris*; mientras que Soto¹⁶ determinó mediante la prueba de susceptibilidad de difusión en discos que el aceite esencial de toronja no presenta actividad antibacteriana contra *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Pseudomona aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella spp.*; posiblemente la diferencia entre estos resultados se deba a que Uysal¹⁷ obtuvo el aceite esencial por el método de Extracción por microondas sin disolvente (SFME), mientras que Soto¹⁶ obtuvo el aceite de las cortezas de toronja por el método de hidrodestilación.

En cuanto a la actividad antifúngica del extracto de *Citrus paradisi*; Krajewska¹¹ mediante el método de dilución en serie, determinó que el extracto de toronja al 33 % presenta actividad antifúngica sobre cepas de *Candida albicans*; resultado similar a la investigación de Cvetnic¹³ quien encontró que el extracto etanólico de semillas y pulpa de toronja, mediante el método de difusión en agar, tiene actividad antifúngica sobre cepas de *Candida albicans*.

La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales depende de diversos factores, entre los que destacan las temporadas de cosecha, las fuentes geográficas, el método de extracción, el índice de madurez de la fruta, la variedad, la estructura química de los componentes del aceite y su concentración, el tiempo y las condiciones en que se encuentre almacenado el aceite esencial, influyen debido a que este es muy sensible a la luz y a las altas temperaturas; por lo que dichos factores pueden intervenir en el poder inhibitorio del aceite.

En esta investigación se controlaron estos factores a fin de preservar la composición del aceite esencial de toronja y así su poder antifúngico.

VII. CONCLUSIONES

-Existe actividad antifúngica *in vitro* del aceite esencial de *Citrus paradisi* “toronja” sobre cepas de *Candida albicans*.

- El aceite esencial de *Citrus paradisi* al 25; 12,5; 6,25; 3,13 y 1,56 % presenta actividad antifúngica sobre cepas de *Candida albicans*, siendo la concentración al 25 % la que presenta halos de inhibición de mayor diámetro, con una media de 12,63 mm; mientras las concentraciones al 0,78 y 0,39 % no presentan actividad antifúngica.

- La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) promedio del aceite esencial de *Citrus paradisi* “toronja” sobre cepas de *Candida albicans* fue al 6,25 %.

VIII. RECOMENDACIONES

-Evaluar la actividad antifúngica y antibacteriana del aceite esencial de *Citrus paradisi* “toronja” frente a otros microorganismos de interés estomatológico.

-Realizar estudios del aceite esencial de *Citrus paradisi* que identifiquen la concentración mínima letal para integrarla en la terapéutica clínica.

- Ampliar estudios enfocados a la caracterización del aceite esencial de *Citrus paradisi*, incluyendo la identificación del o los principios activos, y determinar su mecanismo de acción, así como su efecto en otros hongos de importancia médica.

-Realizar pruebas *in vivo* para valorar la efectividad y la toxicidad que pueden proporcionar los componentes activos de *Citrus paradisi* “toronja” como también poder determinar sus dosis terapéuticas.

-Elaborar diferentes formas farmacéuticas (pastas dentales, colutorios) utilizando aceite esencial de *Citrus paradisi* “toronja” para realizar ensayos clínicos en pacientes con problemas de salud oral.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Araujo J, Salas R. Actividad antimicrobiana de plantas. Rev Cienc Univ. Cient Sur. 2008; 6(2):6-18.
2. Gupta V, Kohli K, Ghaiye P, Bansal P, Lather A. Pharmacological potentials of *Citrus Paradisi* - An overview. Int J of Phytother Res. 2011; 1(1): 8-17.
3. Shiva RC. Estudio de la Actividad Antimicrobiana de Extractos Naturales y Ácidos orgánicos. Posible alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento. Tesis doctoral. Barcelona. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona. 2007.
4. Wen L, Haddad M, Fernández I, Espinoza G, Ruiz C, Neyra E, y col. Actividad antifúngica de cuatro plantas usadas en la medicina tradicional peruana. aislamiento de 3' – formil – 2',4',6' – Trihidroxidihidrochalcona, principio activo de *Psidium acutangulu m*. Rev Soc Quím Perú. 2011; 77(3): 199-204.
5. Pardi G, Guilarte C, Cardozo E. Detección de *Candida albicans* en pacientes con candidiasis pseudomembranosa. Rev Odontol Univ São Paulo. 2008; 20(3): 228-236.
6. Gendreau L, Loewy Z. Epidemiology and Etiology of Denture Stomatitis. J Prosthodont. 2011; 20(4): 25-60.
7. Francisco A, Gonzalez Y, Sexto N, Vazquez A. Estomatitis subprotesis en pacientes portadores de prótesis dental superior. MediSur. 2009; 7(1): 23-27.

8. Benavides V, D'Arrigo G, Pino J. Effects of aqueous extract of *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) on the preimplantational mouse embryos. Rev. peru. biol. 2010; 17(3): 381 – 384.
9. Guerra L, Soto L, Medina Z, Ojeda G, Peña J. Actividad antibacteriana del aceite esencial de cortezas de naranja (*Citrus sinensis*) var. Valencia frente a microorganismos gram positivos y gram negativos. Rev. Fac. Agron. (LUZ). 2014; 31(2): 215-232
10. Flores E, Velasco P, Figueroa N, Gimenez A. Aceites esenciales con propiedades antimicrobianas. Biofarbo. 1999; 7(7): 5-8.
11. Krajewska-Kutak E, Lukaszuk C, Niczyporuk W. Effects of 33 % grapefruit extract on the growth of the yeast-like fungi, dermatophytes and moulds. Wiad Parazytol. 2001; 47(4): 845-849.
12. García G. Respuesta tisular a una pasta tópica a base de *Plantago major* L. y *Citrus paradisi* en gingivitis inducida en lagomorfos. Tesis para optar el título de Cirujano Dentista. Lima. Facultad de Odontología. Universidad de San Martín de Porres. 2003.
13. Cvetnic Z, Vladimir-Knezevic S. Antimicrobial activity of grapefruit seed and pulp ethanolic extract. Acta Pharm. 2004; 54(3): 243-250.
14. Viuda M, Ruiz Y, Fernández J, Pérez J. Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. Food Control. 2007; 19: 1130-1138.

15. Sharma M, Sharma S. Phytochemical Screening and *In vitro* Antimicrobial Activity of Combined *Citrus paradisi* and *Ficus carica* Linn Aqueous Extracts. Intl. J. Microbiol. Res. 2010; 1(3): 162-165.
16. Soto L. Composición y actividad microbiana del aceite esencial de toronja (*Citrus paradisi*). Tesis para optar el grado académico de Magister. Maracaibo. Facultad de ingeniería. Universidad del Zulia. 2010.
17. Uysal B, Sozmen F, Aktas O, Oksal B, Kose E. Essential oil composition and antibacterial activity of the grapefruit (*Citrus paradisi*. L) peel essential oils obtained by solvent-free microwave extraction: comparison with hydrodistillation. Int. J. Food Sci. Technol. 2011; 46(7): 1455–1461.
18. Faleye F, Ogundaini A, Olugbade A. Antibacterial and Antioxidant activities of *Citrus Paradisi* (Grapefruit seed) extracts. JPSI. 2012; 1(3): 63-66.
19. Okunowo W, Oyedeji O, Afolabi L, Matanmi E. Essential Oil of Grape Fruit (*Citrus paradisi*) Peels and Its Antimicrobial Activities. Am. J. Plant Sci. 2013; 4:1-9.
20. Soto L., et al. Caracterización química del aceite esencial de toronja (*Citrus paradisi*). Rev. Fac. Agron. 2013; 30: 266-283.
21. Oikeh E, Omoregie E, Oviasogie E, Oriakhi K. Phytochemical, antimicrobial, and antioxidant activities of different citrus juice concentrates. Food Sci and Nutr. 2016; 4(1): 103-109.

22. Padrón J, Rocha M. Variedades comerciales de cítricos para Nuevo León y Tamaulipas. 1ª Edición. México: Folleto técnico. 2007: 33-34.
23. Alfonso E. Estudio del comportamiento reológico de las pectinas con diferente grado galacturónico obtenida a partir de *Citrus paradisi*. Tesis para optar al grado de licenciatura en química y farmacia. San Salvador. Facultad de química y farmacia. Universidad de El Salvador. 2010.
24. Macías W. Proceso de obtención de extracto a partir de la semilla de la toronja (*Citrus paradisi*), y su aplicación en desinfección de vegetales o frutas y superficies planas. Tesis Ingeniero Químico. Guayaquil. Facultad de ingeniería química. Universidad de Guayaquil. 2014.
25. Martínez J, Gutiérrez A, Molina M, García E, Rodríguez J. Fertilización en cítricos en el estado de Nuevo León. México: Fac. Agronomía, UANL. 2010: 1-30.
26. Inictel- UNI. Guía del participante: Curso producción de cítricos. Lima. 2010.
27. Sauls J. W. 2008. Nutrition and Fertilization. Texas Citrus and Subtropical Fruits. Professor and Extension Horticulturist Texas AgriLife Extension.
28. Juárez J, Castro A, Jaúregui J, Lizano J, Carhuapoma M, y col. Composición química, actividad antibacteriana del aceite esencial de *Citrus sinensis* L. (Naranja dulce) y formulación de una forma farmacéutica. Ciencia e Investigación. 2010; 13(1): 9-13.


29. Navarro M. Potencial de los aceites esenciales de toronjil (*Melissa Officinalis*), orégano (*Origanum vulgare L*) y Bleo (*Pereskia Bleo*), para ser utilizados como saborizantes en aceites comestibles de mesa. Tesis para optar el título de Ingeniero de alimentos. Cartagena D. T y C. Facultad de ingeniería. Universidad de Cartagena. 2012.
30. Nannapaneni R, et. al. *Campylobacter* and *Arcobacter* species sensitivity to comercial orange oil fraction. Int. J. Food Microbiol. 2009; 129 (1): 43-49.
31. Fisher K, Phillips C. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer. Trends in Food Sci. Tech. 2008; 19(3): 156-164.
32. Burt S. Essential Oils: their antibacterial properties and potential applications in foods, a review. Int. J. Food Microbiol. 2004; 94(3): 223-253.
33. Pfaller M, Diekema D. Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. Clin Microbiol Rev. 2007; 20(1): 133-163.
34. Feitosa M, Pereira-Cenci T, Rodrigues L, et al. Efficacy of denture cleansers on denture liners contaminated with *Candida* species. Clin Oral Investig. 2009; 13 (2): 237–242.
35. Jawetz E, Melnick J, Adelberg E. Medical Microbiology, 25 Edición. Estados Unidos: Ed. Mc Graw Hill Lange. 2010:159-164.

36. A Laforet L. Estudio de Pga 26, una proteína implicada en la arquitectura de la pared celular de *Candida albicans*. Tesis Doctoral. Valencia. Facultad de Farmacia. Universidad de Valencia. 2010.
37. Negroni M. Microbiología Estomatológica: Fundamentos y Guía Práctica, 2 Edición. Buenos Aires: Ed. Medica Panamericana. 2009.
38. Sieber C. Recuento de *Streptococcus mutans* en muestras de biofilm sobre dientes restaurados con resina compuesta oclusal versus dientes sanos mediante el método de cubeta. Tesis Cirujano dentista. Santiago Chile. Facultad de odontología. Universidad de Chile. 2012.
39. Johann S, Soldi C, Lyon J, Pizzolatti G, Resende M. Antifungal activity of the amylin derivatives and in vitro inhibition of *Candida albicans* adhesión to human epithelial cells. Lett Appl Microbiol. 2007; 45(2): 148-153.
40. Blanco M, Sacristán B, Lucio L, Blanco J, Pérez C, Gómez A. La hidrofobicidad de la superficie celular como indicador de otros factores de virulencia en *Candida albicans*. Rev Iberoam Micol. 2010; 27(4): 195-199.
41. De la Calle N, Santa C, Cardona N. Factores de virulencia para la infección de tejidos queratinizados por *Candida albicans* y hongos dermatofitos. Rev CES Med. 2012; 26(1): 43-55.
42. Karkowska J, Rapala M. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. Acta Biochim Pol. 2009; 56(2): 211-224.


43. Permán J, Martín E, Rubio M. Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica. Rev Iberoam Micol. 2007; 2(11): 1-20.
44. Bonifaz A. Microbiología Médica Básica, 3ª Edición. México: Mc Graw Hill. 2009: 8-30.
45. Rocafuerte M, Refulio Z, Huamani J. Estomatitis subprotésica: a propósito de un caso clínico. KIRU. 2014; 11(2): 180-183.
46. Al-Dwairi Z. Prevalence and risk factors associated with denture-related stomatitis in healthy subjects attending a dental teaching hospital in North Jordan. J Ir Dent Assoc. 2008; 54(2): 80-83.
47. Kabawat M, de Souza R, Badaro M, de Koninck L, Barbeau J, Rompre P, et al. Phase 1 clinical trial on the effect of palatal brushing on denture stomatitis. Int J Prosthodont. 2014; 27(4):311-9.
48. Bruch J, Triester N. Clinical oral medicine and pathology, 1 edición. New York: Humana Press. 2010: 92.
49. Williams D, Lewis M. Pathogenesis and treatment of oral candidosis. J Oral Microbiol. 2011; 3: 1-11.
50. Acevedo A y col. Composición y capacidad antioxidante de especies aromáticas y medicinales con alto contenido de timol y carvacrol. Scientia et Technica. 2007; 13(33): 125-128.

51. Méndez L, López R, Hernández F. Actualidades en Micología Médica. Eds. México: editorial Sefirot. 2012: 344.
52. Osorio E. Aspectos básicos de Farmacognosia. Universidad de Antioquia. 2009: 3.
53. Duraffourd C, D' Hervicourt L, Lapraz JC. Cuadernos de Fitoterapia Clínica, 1º edición. Barcelona: editorial Masson SA. 1986:86.
54. Linares M, Solís F. Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica-Identificación de levaduras. Rev Iberoam Micol. 2007; 2(11):1-18.
55. Kalembe D, Kunicka A. Antibacterial and Antifungal properties of Essential Oils. Curr Med Chem. 2003; 10(10): 813-829.

X. ANEXOS



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
MUSEO DE HISTORIA NATURAL



"Año de la Consolidación del Mar de Grau"

CONSTANCIA N° 67-USM-2016

LA JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (fruto) recibida de **Diana CHURATA OROYA**, de la Universidad NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS Facultad de Odontología, ha sido estudiada y clasificada como: ***Citrus x paradisi* Macfad.** y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUBCLASE: ROSIDAE

ORDEN: SAPINDALES

FAMILIA: RUTACEAE

GENERO: *Citrus*


ESPECIE: *Citrus x paradisi* Macfad.

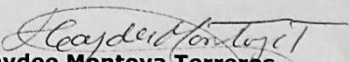
N.V. "toronja"

Determinado por: Biólogo: Severo Baldeón M.

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.

Lima, 29 abril de 2016




Dra. Haydee Montoya Terreros
JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

Av. Arenales 1256, Jesús María
Apdo. 14-0434, Lima 14, Perú

Telfs. (511)471-0117, 470-4471,
470-7918, 619-7000 anexo 5703

e-mail: museohn@unmsm.edu.pe
<http://museohn.unmsm.edu.pe>

Figura 6. Clasificación Taxonómica

Tabla 7. Ficha de recolección de datos

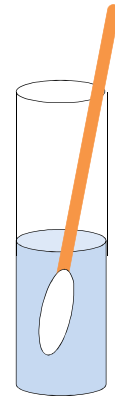
MEDICIÓN DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN SOBRE CEPAS DE <i>CANDIDA ALBICANS</i>												
Aceite esencial <i>C.</i> <i>paradisi</i>	Placa 01	Placa 02	Placa 03	Placa 04	Placa 05	Placa 06	Placa 07	Placa 08	Placa 09	Placa 10	Placa 11	Placa 12
Aceite 25 %												
Aceite 12,5 %												
Aceite 6,75 %												
Aceite 3,13 %												
Aceite 1,56 %												
Aceite 0,78 %												
Aceite 0,39 %												
Control (+)												
Clorhexidina												
Control (-)												
DMSO												

FLUXOGRAMA DE PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS

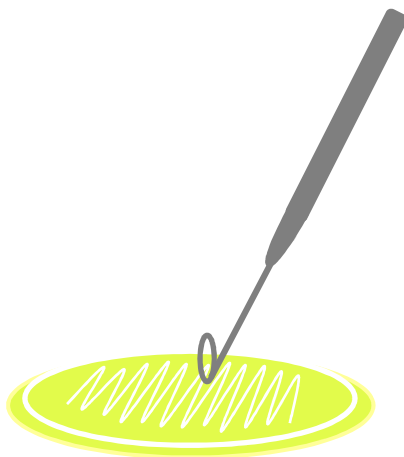
Aislamiento e identificación de *Candida albicans*



Toma de muestra: Hisopado de paladar



Suero fisiológico

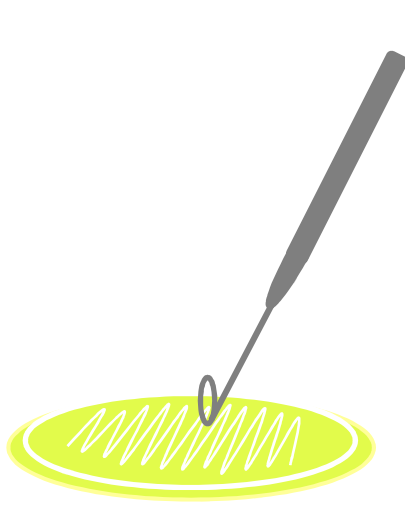


Siembra en agar sabouraud
Incubación 48 horas



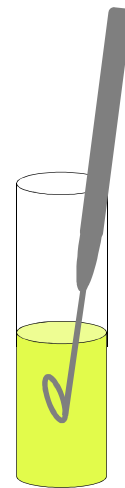
Descripción / lectura de colonias

Prueba de tubo germinativo para identificación de *Candida albicans*



Tomar una colonia y hacer resiembra en agar sabouraud

Incubación 37°C por 24 horas



Suspender inóculo en suero humano

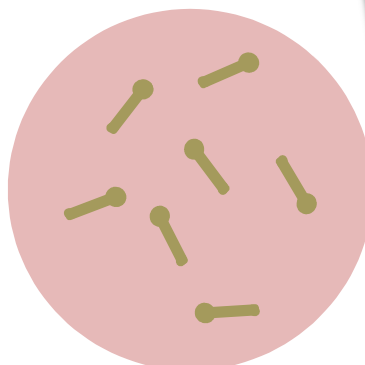
Incubación 37° C por 4 horas



Extender una gota de la emulsión en lámina portaobjeto



Observar al microscopio

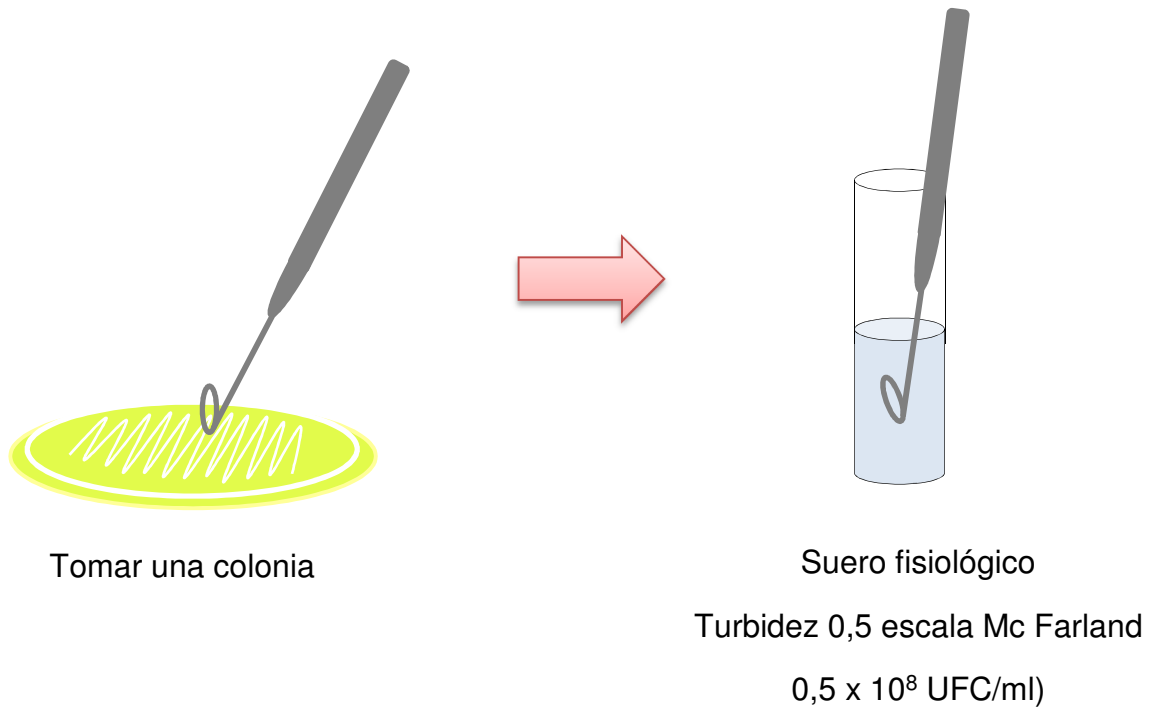


Prueba de tubo germinativo (+)

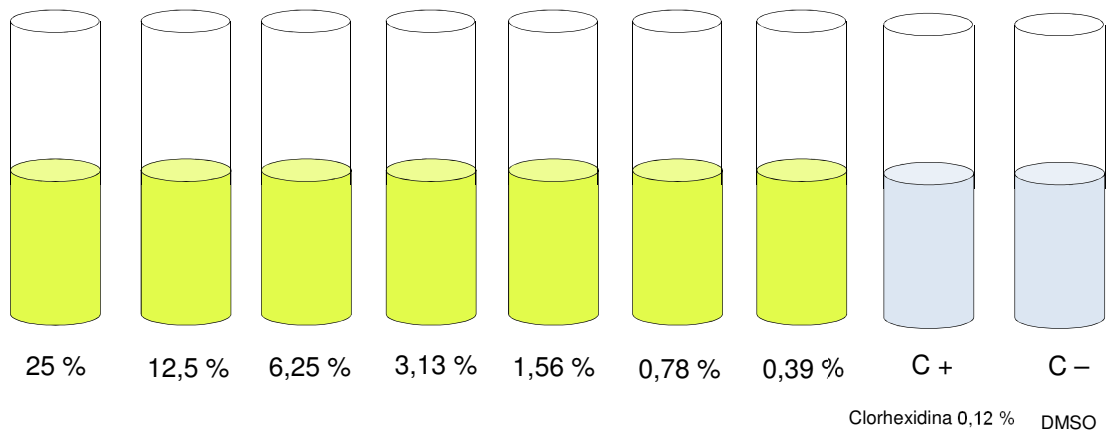
Candida albicans

Prueba de sensibilidad antifúngica

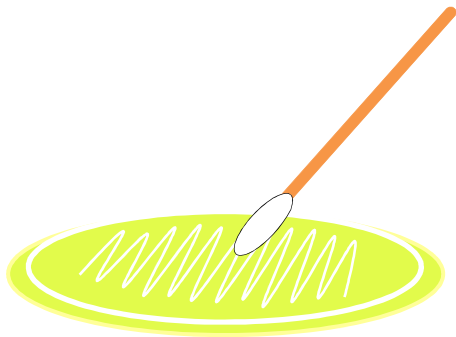
Estandarización de la cepa de *Candida albicans*



Diluciones del aceite esencial de *Citrus paradisi*

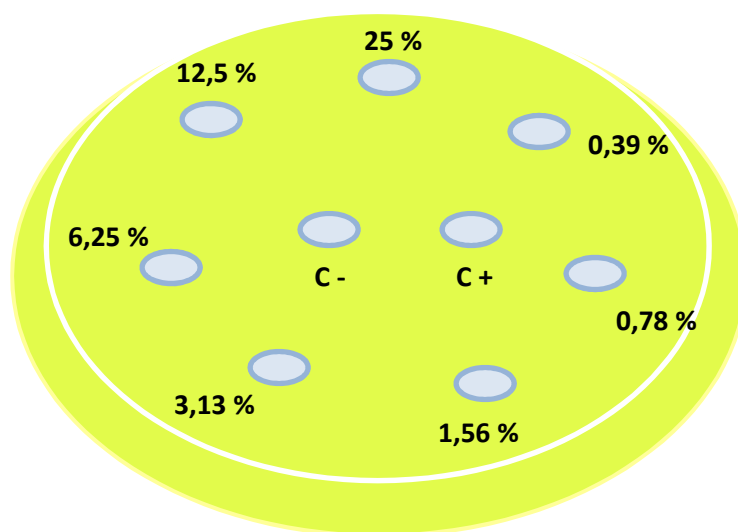


Siembra de la muestra



Agregar 100 uL de muestra estandarizada
Siembra por diseminación en agar sabouraud
Pozos de difusión con sacabocado de 6mm de diámetro
Depositar 50 uL de cada solución

Test de difusión en agar con pozos



Incubar en aerobiosis, a 37°C por 48 horas



Figura 7. Cáscaras de *Citrus paradisi*



Figura 8. Obtención del aceite esencial de *Citrus paradisi*



Figura 9. Aceite esencial de *Citrus paradisi*

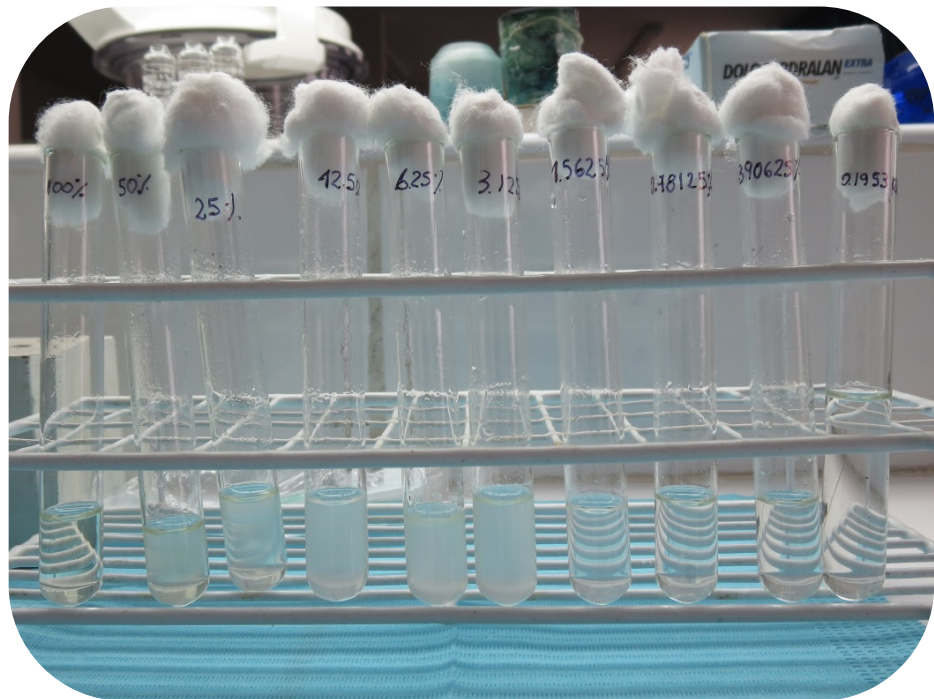


Figura 10. Dilución del aceite esencial de *Citrus paradisi*



Figura 11. Mucosa de paciente con estomatitis subprotésica

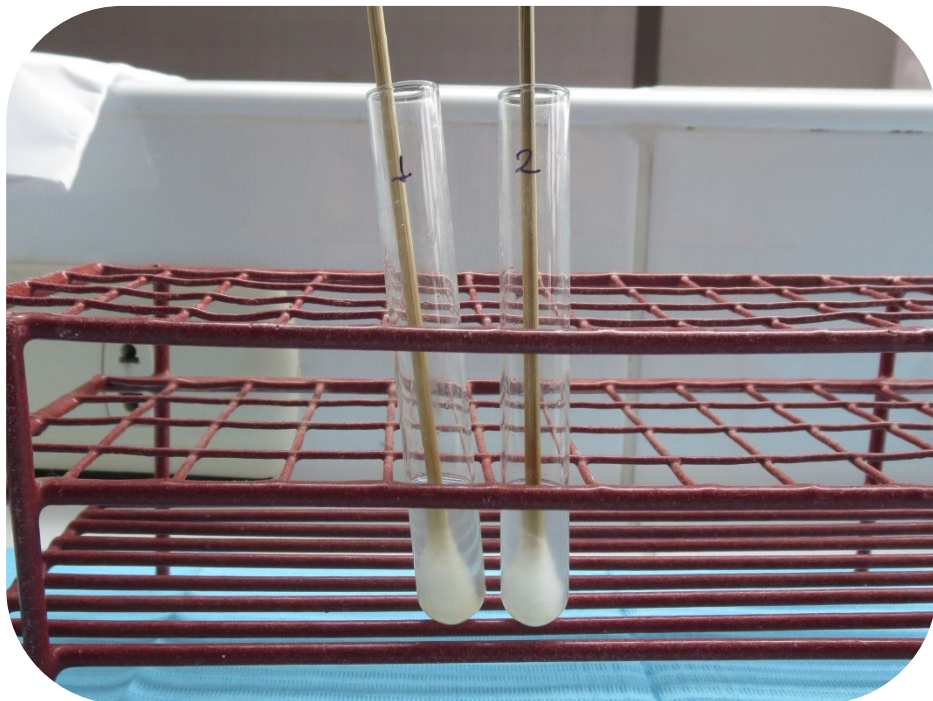


Figura 12. Recolección de muestra de *Candida albicans*



Figura 13. Prueba de tubo germinativo para identificación de *Candida albicans*

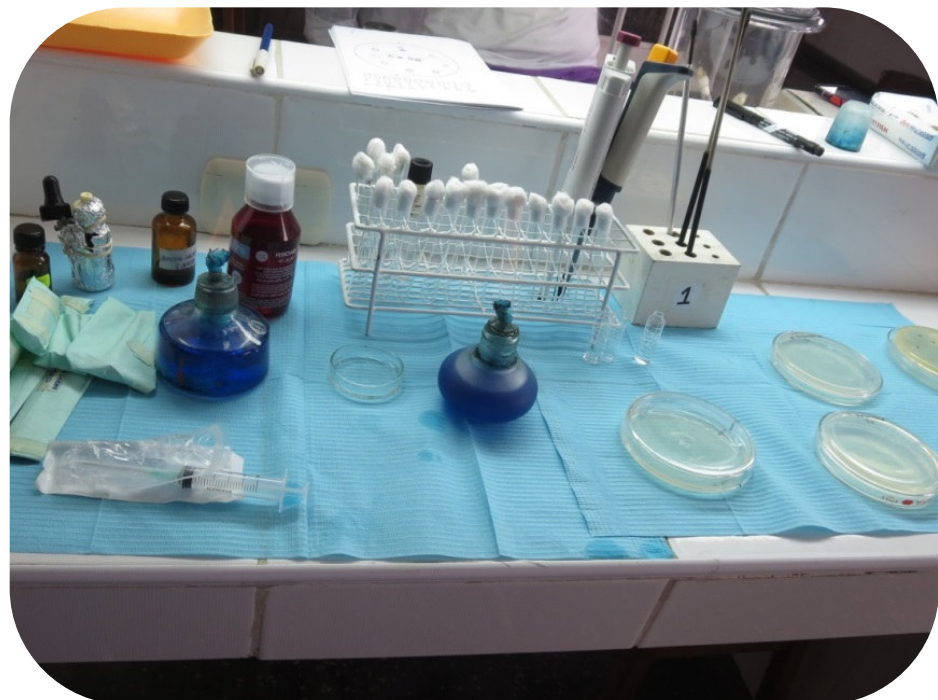


Figura 14. Mesa de trabajo para el enfrentamiento

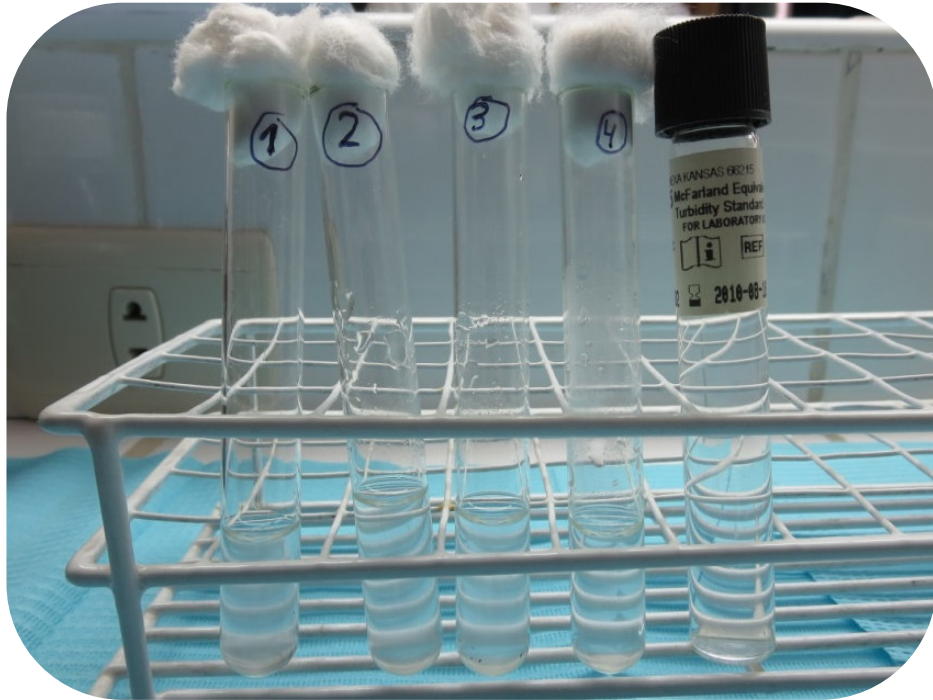


Figura 15. Cepa de *Candida albicans* comparada a la escala de Mc Farland al 0.5

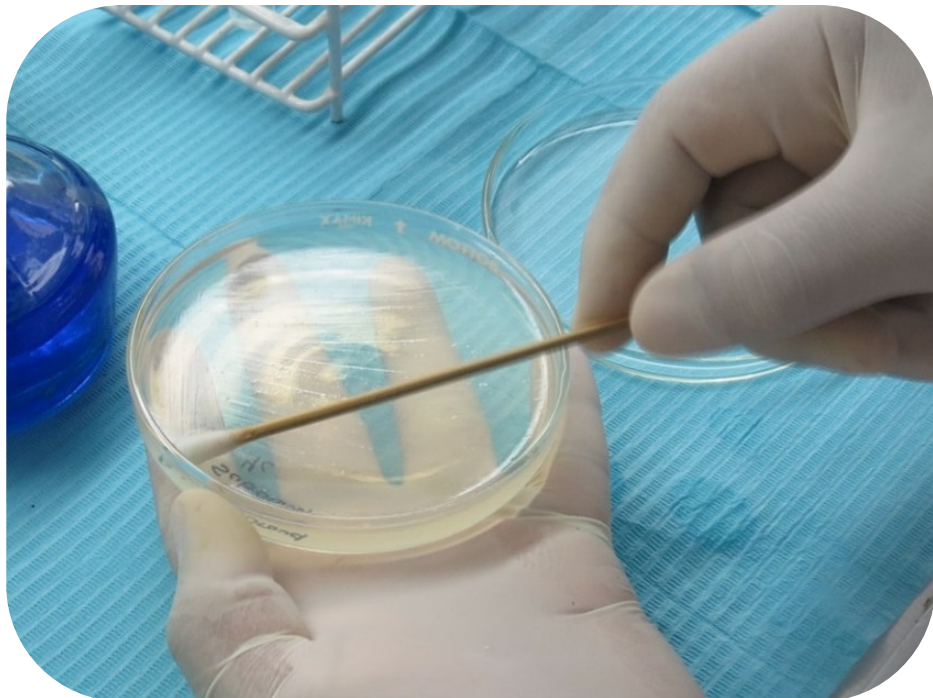


Figura 16. Sembrado de la cepa de *Candida albicans* en agar dextrosa sabouraud

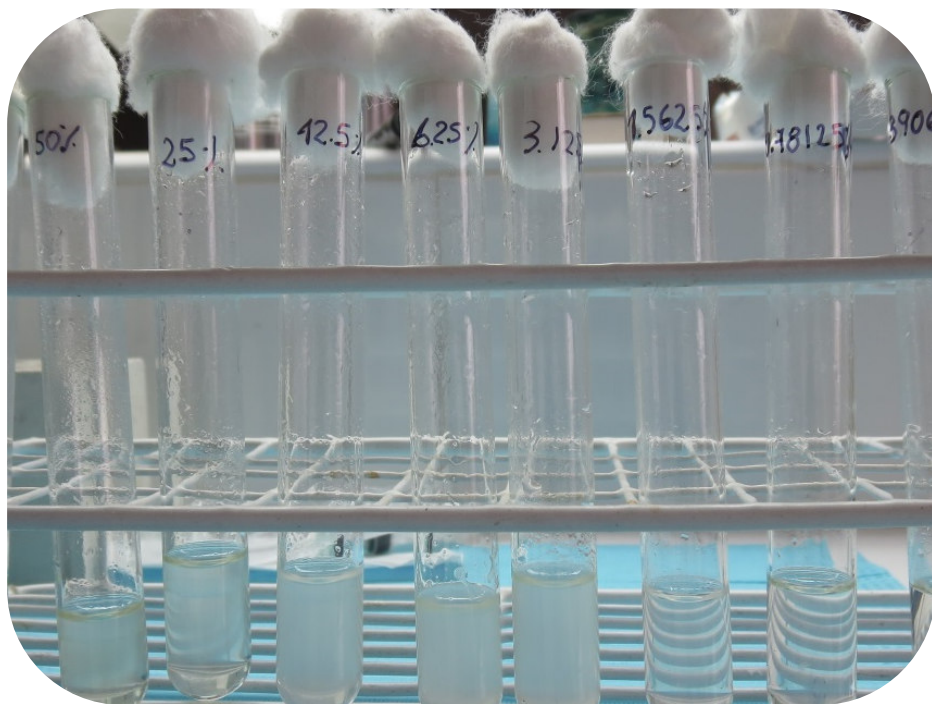


Figura 17. Aceite esencial de *Citrus paradisi* al 25; 12,5; 6,25; 3,13; 1,56; 0,78 y 0,39 %

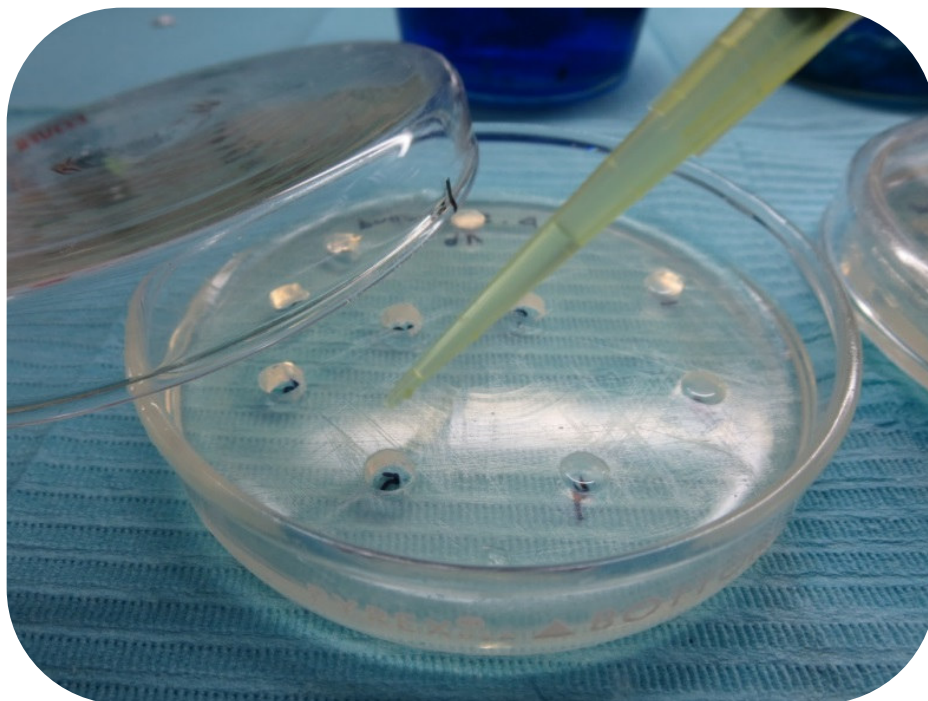


Figura 18. Incorporación de 50 μ l de las muestras en cada pozo de difusión

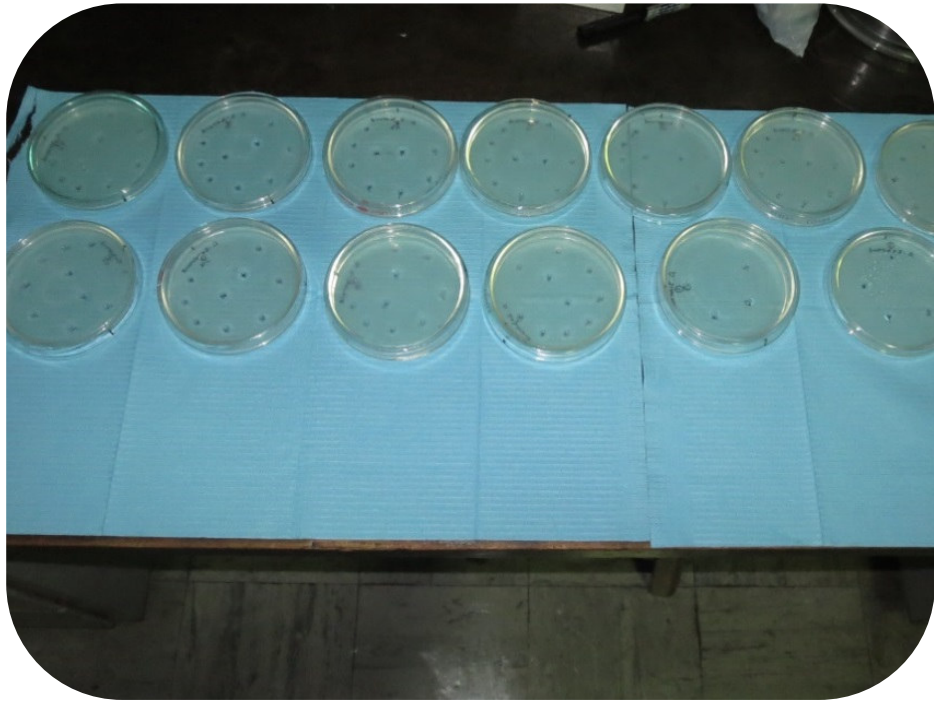


Figura 19. Colocación de placas petri a incubación

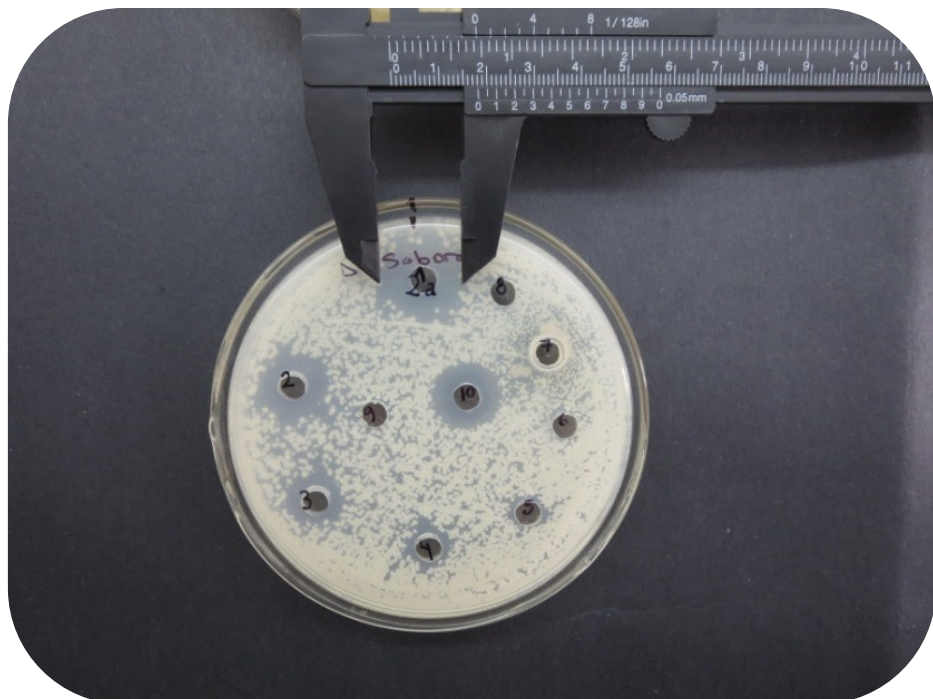


Figura 20. Medición con vernier de los halos de inhibición del aceite esencial al 25;
12,5; 6,25; 3,13; 1,56; 0,78 y 0,39 %, Clorhexidina al 0,12 % y DMSO